



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD CIENCIAS DE LA INGENIERÍA
CARRERA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Proyecto de Investigación previo
a la obtención del título de
Ingeniero Agroindustrial.

Proyecto de Investigación

**Evaluación del proceso fermentativo del mucílago del cacao
aplicando *saccharomyces cerevisiae* para la producción de
bioetanol**

Autor

Gabriela del Carmen Angulo Ortega

Director de Proyecto de Investigación

Ing. José Vicente Villarroel Bastidas, MSc.

Quevedo – Los Ríos - Ecuador

2017



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Gabriela del Carmen Angulo Ortega**, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normatividad institucional vigente.

f. _____

Gabriela del Carmen Angulo Ortega

C.C. # 1206685255



CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Ing. José Villarroel Bastidas, MSc.**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Gabriela del Carmen Angulo Ortega**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado **“EVALUACIÓN DEL PROCESO FERMENTATIVO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO APLICANDO *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL”**, previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial, bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

Ing. José Villarroel Bastidas, MSc.

DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

Ing. José Villarroel Bastidas, MSc, en calidad de Director de Proyecto de Investigación titulado “EVALUACIÓN DEL PROCESO FERMENTATIVO DEL MUCÍLAGO DEL CACAO APLICANDO *Saccharomyces cerevisiae* PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL”, me permito manifestar a usted y por intermedio del Consejo Académico lo siguiente:

Que, la Srta. GABRIELA DEL CARMEN ANGULO ORTEGA, egresada de la Facultad de Ciencias de la Ingeniería, carrera Ingeniería Agroindustrial, ha cumplido con las correcciones pertinentes, e ingresado su Proyecto de Investigación al sistema URKUND, tengo bien certificar la siguiente información sobre el informe del sistema anti plagio con un porcentaje de 7%.

URKUND	
Dokument	EVALUACION DEL PROCESO FERMENTATIVO DE MUCILAGO DE CACAO.docx (ID31047090)
Inskickat	2017-10-05 10:11 (-05:00)
Inskickad av	José Villarroel (jvillarroel@uteq.edu.ec)
Mottagare	jvillarroel.uteq@anayasa.arkund.com
Meddelande	Visa hela meddelandet
	7% av det här c.a. 30 sidor stora dokumentet består av text som också förekommer i 0 st källor.

Ing. José Villarroel Bastidas, MSc.
DIRECTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN



CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO FACULTAD CIENCIAS DE LA INGENIERÍA CARRERA INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Tema

**“EVALUACIÓN DEL PROCESO FERMENTATIVO DEL
MUCÍLAGO DEL CACAO APLICANDO *Saccharomyces cerevisiae*
PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOETANOL”**

Presentado al Consejo Académico como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Agroindustrial.

Aprobado por:

Ing. Luis Mera Chinga, Mg. Sc
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Robert Moreira Macías, MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Andrea Cortez Espinoza, MSc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

**QUEVEDO – LOS RIOS – ECUADOR
2017**

Agradecimiento

Nadie dijo que llegar hasta aquí sería fácil, pero sin duda alguna vale la pena cada paso transcurrido; el estar en esta etapa implica un largo proceso de esfuerzo, dedicación y ayuda de personas que estuvieron durante todo este suceso, es por esto que agradezco a

Dios, a mis familiares y demás personas que de uno u otro modo colaboraron en la realización de este proyecto de investigación y especialmente a mi director del Proyecto de Investigación Ing. José Villarroel, por su invaluable ayuda.

Gabriela Angulo Ortega

Dedicatoria

Con mucho cariño, dedico mi proyecto a mis padres
Ab. Nervo Angulo y Sra. Frecia Ortega por su
abnegación y esfuerzo.

A mi sobrinito Sebastián

A mi enamorado Ing. Martin PARRALES

Y mis amigos: Estefanía Trujillo, Econ. Doménica,
Ing. Anthony y Econ. Estefanía Sarabia

Gabriela Angulo Ortega

Resumen

El objetivo del estudio es obtener un bioetanol a partir de mucílago de cacao de dos variedades, mediante fermentación de levadura silvestre en diferentes porcentajes de inoculación. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar con arreglo Trifactorial A x B x C, factor A, 2 Variedades de cacao (Nacional y CNN51), factor B, 3 niveles de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (0%, 0,01% y 0,05%) y factor C, 2 tipos de materia prima (Sólido y líquido), con 12 tratamientos y 2 repeticiones, los mismos que da un total de 24 unidades experimentales conformadas por 4000 g por cada muestra, envasadas para proceso fermentativo. Se realizó análisis de varianza (ADEVA), se estableció las diferencias entre promedios de tratamientos de acuerdo a las características físico-químicas de los biocombustibles, y se comparó con la prueba de Tukey. Los análisis realizados al bioetanol destilado si presentaron diferencia estadística en el pH, °Brix, Acidez y °GL, Densidad, Calor específico, Turbidez, Rendimiento. El análisis de combustión se lo realizó al mejor tratamiento entre una mezcla del 10% de etanol y 90% de gasolina. Los resultados obtenidos indican que la muestra (CCN51+ 0,05% de levadura + líquido), mostró mejores características químicas y físicas siendo el mejor tratamiento.

Palabras claves: Turbidez; Calor específico; Levadura silvestre; Densidad, Grados alcohólicos

Abstract

The objective of the study is to obtain a bioethanol from cocoa mucilage two varieties, by fermentation of wild yeast in different percentages of inoculation. A completely randomized design was applied with Trifactorial arrangement A x B x C, factor A, 2 Cacao varieties (National and CNN51), factor B, 3 levels of yeast *Saccharomyces cerevisiae* (0%, 0,01% and 0,05 %) and factor C, 2 types of raw material (solid and liquid), with 12 treatments and 2 replicates, which gives a total of 24 experimental units conformed by 4000 g for each sample, packaged for fermentation process. We performed variance analysis (ADEVA), established the differences between averages of treatments according to the physicochemical characteristics of biofuels, and compared with the Tukey test. The analyzes carried out on distilled bioethanol showed statistical difference in pH, ° Brix, Acidity and ° GL, Density, Specific heat, Turbidity, Yield. The combustion analysis was performed to the best treatment between a mixture of 10% ethanol and 90% gasoline. The results indicated that the sample (CCN51 + 0.05% yeast + liquid) showed better chemical and physical characteristics being the best treatment.

Keywords: Turbidity; Specific heat; Wild yeast; Density, Alcoholic Degrees

Índice

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO.....	iv
CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN.....	v
Agradecimiento.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Índice.....	xiv
Índice de Tablas.....	xiv
Índice de Gráficos.....	xv
Índice de Anexos.....	xvi
Código Dublín.....	xvii
Introducción.....	1
CAPÍTULO I.....	2
CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.1 Problema de investigación.....	3
1.1.1 Planteamiento del problema.....	3
Diagnóstico.....	3
1.1.2 Formulación del problema.....	4
1.1.3 Sistematización del problema.....	4
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo General.....	4
1.2.2 Objetivos Específicos.....	5
1.3 Justificación.....	5
1.4 Hipótesis.....	6
1.4.1 Hipótesis nula.....	6
1.4.2 Hipótesis alternativa.....	6

CAPÍTULO II.....	7
FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
2.1 Marco teórico.....	8
2.1.1 Cacao.....	8
2.1.2 Clasificación Taxonómica del Theobroma cacao L.....	8
2.1.3 Fenología Theobroma cacao L.....	8
2.1.4 Mucílago.....	9
2.1.5 Mucílago de cacao.....	9
2.1.6 Semillas de cacao.....	10
2.1.7 Variedades comunes del cacao.....	11
2.1.8 Levadura silvestre.....	12
2.1.9 Levaduras utilizadas en fermentaciones alcohólicas.....	12
2.1.10 Saccharomyces cerevisiae.....	12
2.1.11 Proceso tecnológico para la producción de alcohol y levadura Saccharomyces cerevisiae.....	13
2.1.12 Proceso fermentativo.....	13
2.1.13 Fermentación.....	13
2.1.14 Fermentación bacteriana.....	14
2.1.15 Fermentación alcohólica.....	15
2.1.16 Tipos de alcoholes.....	15
2.2 Principales referencias bibliográficas.....	17
2.2.1 Influencia de la Temperatura en la fermentación alcohólica.....	17
2.2.2 Fermentación alcohólica de jugo de naranja con Saccharomyces cerevisiae.....	17
2.2.3 Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación.....	18
2.2.4 Uso del exudado y placenta del cacao para la obtención de subproductos..	18
2.2.5 Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana.....	18
2.2.6 Análisis del Potencial Competitivo del Bioetanol en Colombia.....	19
2.2.7 Producción de biodiesel y bioetanol: ¿Una alternativa sustentable a la crisis energética?.....	19
2.2.8 Biocombustibles líquidos: procesos y tecnologías.....	19

2.2.9	Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos.....	20
2.2.10	Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas.....	20
2.2.11	Impacto de la producción de bioetanol en el mercado del maíz.....	20
2.2.12	Norma Técnica Ecuatoriana INEN 176:2006. Cacao en grano. Requisitos.....	21
	CAPÍTULO III.....	22
	MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	22
3.1	Localización.....	23
3.2	Tipo de investigación.....	24
3.2.1	Investigación de campo.....	24
3.2.2	Investigación Cuantitativa.....	24
3.2.3	Investigación Explicativa.....	25
3.2.4	Investigación Bibliográfica y Documental.....	25
3.3	Métodos de investigación.....	25
3.3.1	Método deductivo – inductivo.....	25
3.3.2	Método analítico de los análisis físicos y químicos.....	26
3.3.4	Método estadístico.....	26
3.3.5	Metodología del experimento.....	26
3.4	Fuentes de recopilación de información.....	27
3.5	Diseño de la investigación.....	27
3.5.1	Diseño experimental del bioetanol destilado de mucílago de cacao.....	27
3.5.2	Factores de estudio.....	27
3.5.3	Tratamientos.....	28
3.5.4	Análisis Estadísticos.....	29
3.6	Instrumentos de investigación.....	30
3.6.1	Manejo específico del experimento.....	30
3.6.2	Análisis físicos-químicos.....	32
3.7	Tratamiento de los datos.....	34
3.8	Diseño experimental.....	34
3.9	Recursos humanos y materiales.....	35
3.10	Materiales y reactivos.....	36

3.10.1	Materia prima e insumos para la fermentación del mucílago de cacao.....	36
3.10.2	Aparatos y Materiales del proyecto de investigación.....	37
	CAPÍTULO IV.....	39
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
4.1	Resultados.....	40
4.1.1	Resultados del Análisis de Varianza.....	40
4.1.2	Resultados con respecto al tipo de variedad de cacao que se obtenga mayor rendimiento.....	43
4.1.3	Flujograma de proceso de la obtención de bioetanol a partir de mucílago de cacao.....	44
4.1.4	Resultados del ensayo de significación (tukey $p < 0,05$) con respecto a los Análisis Físicos y Químicos, de acuerdo con los niveles de estudio.....	44
4.1.4.1	Resultados de acuerdo con el Factor A (variedades de cacao).....	46
4.1.4.2	Resultados del Factor B (porcentaje de levadura).....	54
4.1.4.3	Resultados del Factor C (tipo de materia prima).....	55
4.2	Discusión.....	56
4.2.1	Discusión de Resultados.....	56
4.3	Tratamiento de hipótesis.....	62
	CAPÍTULO V.....	63
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
5.1	Conclusiones.....	64
5.2	Recomendaciones.....	65
	CAPÍTULO VI.....	66
	BIBLIOGRAFÍA.....	66
	CAPÍTULO VII.....	77
	ANEXO.....	86

Índice de Tablas

Tablas		Pag.
1	Clasificación Taxonómica.....	8
2	Composición del mucílago de cacao.....	9
3	Contenido de las semillas (cacao por cada 100g).....	10
4	Contenido de las semillas (cacao por cada 100g).....	11
5	Composición de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
6	Productos de la fermentación bacteriana.....	14
7	Localización.....	23
8	Ubicación Geográfica La Nueva Casa de Cacao S. A.....	23
9	Ubicación Geográfica Campus "La María".....	24
10	Factores de estudio que intervienen en la elaboración de bioetanol.....	28
11	Combinación de los tratamientos propuestos para la evaluación del proceso fermentativo.....	29
12	Esquema del análisis de varianza para la evaluación del proceso fermentativo del mucílago de cacao, aplicando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la producción de bioetanol.....	30
13	Materiales.....	35
14	Materia prima e insumos.....	36
15	Aparatos para la obtención de bioetanol a partir de mucílago de cacao...	37
16	Materiales de laboratorio.....	38
17	Análisis de Varianza de °Brix (%), suma de cuadrados tipo III.....	40
18	Análisis de Varianza en Acidez (%), suma de cuadrados tipo III.....	41
19	Análisis de Varianza para grados alcohólicos, suma de cuadrados tipo III.....	41
20	Análisis de Varianza para Turbidez (NTU), suma de cuadrados tipo III...	42
21	Análisis de Varianza para Rendimiento (mL), suma de cuadrados tipo III.....	43

Índice de Gráficos

Gráficos		Pag.
1	Diagrama sobre de modo de acción de las bacterias en la fermentación.....	14
2	Resultados de las oposiciones entre Nacional y CCN51 de la cata de significación tukey. 1.pH(DS); 2. Brix (DS); 3. Acidez titulable (DS); 4. Grados alcohólicos (DS).....	46
3	Resultados del contraste de medias de Nacional y CCN51 en el experimento de significación Tukey ($p < 0.05$). 1. Densidad (DS); 2. Turbidez (DS); 3. Calor específico (DS); 4. Rendimiento (DS).....	47
4	Resultados de las diferencias de las proporciones de levadura 0%, 0,01 y 0,05% en la prueba de significación Tukey. 1. pH (DS); 2. Brix (DS); 3. Acidez Titulable (DS); 4. Grados alcohólicos (DS).....	48
5	Resultados de las diferencias en los porcentajes de 0%, 0,01 y 0,05%, realizado un ensayo de significación Tukey ($p < 0.05$). 1. Densidad (DS); 2. Turbidez (DS); 3. Calor específico (DS); 4. Rendimiento (DS).....	49
6	Resultados de los contrastes entre sólido y liquido de la cata de significación Tukey ($p < 0.05$). 1. pH (DS); 2. Brix (DS); 3. Acidez Titulable (DS); 4. Grados alcohólicos (DS).....	51
7	Resultados entre sólido y líquido de la prueba Tukey. 1. Densidad (DS); 2. Turbidez (DS); 3. Calor específico (DS); 4. Rendimiento (DS).....	52

Índice de Anexos

Anexos		Pag.
1	Valores de los análisis realizados al bioetanol destilado a partir del mucílago de cacao.....	78
2	Análisis de Varianza para pH (%) - Suma de Cuadrados Tipo III.....	78
3	Análisis de Varianza para Densidad (g) - Suma de Cuadrados Tipo III.....	79
4	Análisis de Varianza para Calor específico (calg°C)- Suma de Cuadrados Tipo III.....	79
5	Modelo del proceso fermentativo del mucílago de cacao para la producción de bioetanol.....	80
6	Fotografías del proceso fermentativo del mucílago de cacao, para la producción de bioetanol.....	81
7	Fotografías de los análisis físico-químicos.....	82
8	Certificado de Laboratorio de Bromatología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.....	83
9	Certificado del Laboratorio de Suelo y Agua de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.....	84
10	Certificado del Laboratorio de Termología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.....	86
11	Certificado del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.....	87
12	Norma Técnica Mexicana NMX-V-034-1982. ALCOHOL ETÍLICO (ETANOL).....	88
13	Norma Técnica Ecuatoriana INEN 368. Pisco requisitos.....	89

Código Dublín

Título:	“Evaluación del proceso fermentativo del mucílago del cacao aplicando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la producción de bioetanol”				
Autor:	Gabriela del Carmen Angulo Ortega				
Palabras clave:	Turbidez	Calor específico	Levadura silvestre	Densidad	Grados alcohólicos
Fecha de publicación:	DD-MM-AA				
Editorial:	Quevedo: UTEQ, 2017.				
Resumen	<p>El objetivo del estudio es obtener un bioetanol a partir de mucílago de cacao dos variedades, mediante fermentación de levadura silvestre en diferentes porcentajes de inoculación. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar A x B x C, factor A, 2 Variedades de cacao (Nacional y CNN51), factor B, 3 niveles de levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (0%, 0,01% y 0,05%) y factor C, 2 tipos de materia prima (Sólido y líquido), con 12 tratamientos y 2 repeticiones, los mismos que da un total de 24 unidades experimentales conformadas por 4000 g por cada muestra, envasadas para proceso fermentativo. Se realizó análisis de varianza (ADEVA), se estableció las diferencias entre promedios de tratamientos de acuerdo a las características físico-químicas de los biocombustibles, y se comparó con la prueba de Tukey. Los resultados obtenidos indican que la muestra (CCN51+ 0,05% de levadura + líquido), es el mejor tratamiento.</p> <p>Abstract. -The objective of the study is to obtain a bioethanol from cocoa mucilage two varieties, by fermentation of wild yeast in different percentages of inoculation. A completely randomized A x B x C, factor A, 2 Cacao varieties (National and CNN51), factor B, 3 levels of yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (0%, 0,01% and 0,05 %) and factor C, 2 types of raw material (solid and liquid), with 12 treatments and 2 replicates, which gives a total of 24 experimental units conformed by 4000 g for each sample, packaged for fermentation process. We performed variance analysis (ADEVA), established the differences between averages of treatments according to the physicochemical characteristics of biofuels, and compared with the Tukey test. The results indicated that the sample (CCN51 + 0.05% yeast + liquid), is the best treatment.</p>				
Descripción:	105 hojas: dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM 6162				
URI:	<u>(en blanco hasta cuando se dispongan los repositorios)</u>				

Introducción

El etanol se considera una fuente alterna de energía y se puede obtener a partir de diferentes fuentes, como los azúcares, almidón y los materiales lignocelulósicos, sin embargo, su aprovechamiento depende de la tecnología utilizada para su producción [1]. En el presente estudio se desarrolla un proceso para la producción de bioetanol a partir del mucílago de cacao, obtenido de la Casa de Cacao de la Ciudad de Quevedo, finalmente, para el proceso de fermentación se utilizó levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El mucílago para la producción de bioetanol es un medio que contiene características elementales, el principio activo del mucílago del cacao son los grados Brix que son los que actúan en el proceso de fermentación, en el cual los carbohidratos son transformados en azúcares simples por medio de la levadura del género *Saccharomyces* que lo convierten en etanol pasando luego por el proceso de destilado y así obtener bioetanol como producto final [2].

Los análisis (pH, acidez, °Brix, grados alcohólicos, densidad, calor específico, turbidez) fueron realizados en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en los Laboratorios de Bromatología, Termología y Laboratorio de Suelos y Aguas respectivamente, la levadura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) se adquirió en el Comisariato del Paseo Shopping. La producción de bioetanol favorecerá a todos los productores de las zonas, debido a que el mucílago de cacao no es aprovechado, siendo este un factor de alto grado de contaminación al medio ambiente.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de investigación

1.1.1. Planteamiento del problema

Diagnóstico

Actualmente el Ecuador es uno de los principales países productores de cacao en Latinoamérica, con alta variabilidad de la materia prima [3]. El cacao por lo general es un producto de la zona que cuando llega a los centros de acopio tiene una etapa de fermentación y es hidrolizada por microorganismos; la hidrolizada es conocida en la industria como “exudado”, este a su vez genera la destilación del mucílago de cacao también conocido como la baba de cacao y tiende a desperdiciarse [4]. Entre tanto, normalmente se llegan a desperdiciarse más de 70 litros por tonelada de este material mucilaginoso [5].

Uno de los mayores problemas de los pequeños productores de cacao, es que no aprovechan el mucílago (subproducto del Cacao), ya que, al momento de la fermentación del Cacao, el exudado del mucílago es desechado, ya que el sabor es dulce, favorece a la presencia de insectos y roedores, aumentando el riesgo de contaminación por hongos, olores y sabores indeseables lo que afecta el aspecto externo y el sabor del producto final, el problema que se pretende estudiar es la relación del mucílago de cacao con la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para obtener un bioetanol a gran escala con alto contenido en biomasa [6].

Pronóstico

En el Ecuador no existen otros usos industriales adicionales del mucílago de cacao, la no industrialización del mucílago ocasiona bajo ingresos para los productores de cacao y el desperdicio puede convertirse en un problema de contaminación ambiental. El estudio sobre la producción de bioetanol a partir de mucílago de cacao, es una real necesidad para todos los cultivadores de cacao ya que podría convertirse en una estrategia para incrementar los ingresos, dar un valor agregado, y así poder contribuir al desarrollo cacaotero, y trabajar en la reducción del impacto ambiental.

1.1.2. Formulación del problema

¿Qué efecto tiene la relación entre el mucílago de cacao (*Theobroma cacao L*) y la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), en el contenido de biomasa del bioetanol?

1.1.3. Sistematización del problema

¿De acuerdo a la relación del mucílago de cacao y el porcentaje de levadura se verá influenciada las características del bioetanol?

¿Cuál será el porcentaje de levadura que brinde mejores resultados para la producción de bioetanol?

Los indicadores a evaluar en la presente investigación serán los siguientes:

Análisis físicos: densidad, rendimiento, turbidez, calor específico, poder de combustión

Análisis químicos: pH, acidez, °Brix, grados alcohólicos

La investigación considera el uso primordial del mucílago de dos variedades de cacao (Nacional y CCN-51), que por el desconocimiento de sus cualidades no es utilizado como una alternativa para la elaboración de bioetanol mediante el empleo de formulaciones adecuadas que puedan brindar al consumidor un producto alternativo, que sea utilizado.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar el proceso fermentativo del mucílago del cacao aplicando *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de bioetanol.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar el tipo de variedad de cacao (CCN51 y Nacional), del que mayor rendimiento se obtenga de biocombustible

- Establecer los porcentajes de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*), en el proceso fermentativo al (0% - 0,01% - 0,05%)
- Evaluar el proceso fermentativo del cacao en forma sólida (semillas) y líquida (baba)

1.3. Justificación

El desarrollo de un nuevo producto con mucílago de cacao, esta revolución productiva se desarrolló con dos tipos de cacao (CCN51 y Nacional), los cuales contienen buenas características fermentativas, el material obtenido y recolectado en este sistema de producción es abundante. Se justifica esta investigación con el aprovechamiento del mucílago de cacao (baba o exudado de cacao), para la producción de bioetanol lo cual constituiría una nueva alternativa de comercialización y generar ingresos económicos a los productores [7].

Con la ejecución de este estudio se da una alternativa de aprovechamiento del exudado de cacao, mediante la elaboración de bioetanol, que proporciona valor agregado al exudado, este producto se convierte en el desarrollo de un sistema de producción agroindustrial novedoso y provechoso, generando un impacto de avance económico, tecnológico para el entorno de la industria consolidando su posición competitiva en el mercado, por lo tanto, beneficiará el sector agrónomo con industrialización de la materia prima (mucílago de cacao) de dos tipos de variedades de cacao (CCN51 y Nacional) las cuales son poco aprovechadas [8].

A través de este estudio se está impulsando el aprovechamiento del mucílago de cacao para elaborar un bioetanol, ya que dicho exudado (mucílago de cacao) no tiene ningún uso dentro de la industria, controlando la concentración de levaduras al 0%, 0,05% y 0,01%, y regulando el contenido de los grados alcohólicos para la obtención de bioetanol con

características físicas y químicas aceptables [9]. Para continuar con esta investigación se deberá hacer un seguimiento sobre la aplicación, rendimiento y rentabilidad de este biocombustible [9].

1.4. Hipótesis

1.4.1. Hipótesis nula

Ho: El tipo de variedad de cacao (CCN51 y Nacional), no influyen en el proceso fermentativo del mucílago de cacao, para la producción y rendimiento del bioetanol como producto final.

Ho: La aplicación de los porcentajes de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, no influyen en el proceso fermentativo del mucílago de cacao, para la producción y rendimiento del bioetanol como producto final.

Ho: La materia prima del cacao en forma sólida (semillas) y líquida (baba), no influyen en el proceso fermentativo del mucílago de cacao, para la producción y rendimiento del bioetanol como producto final.

1.4.2. Hipótesis alternativa

Ha: El tipo de variedad de cacao (CCN51 y Nacional), influye en el proceso fermentativo del mucílago de cacao, para la producción y rendimiento del bioetanol como producto final.

Ha: La aplicación de los porcentajes de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, influye en el proceso fermentativo del mucílago de cacao, para la producción y rendimiento del bioetanol como producto final.

Ha: La materia prima del cacao en forma sólida (semillas) y líquida (baba), influye en el proceso fermentativo del mucílago de cacao, para la producción y rendimiento del bioetanol como producto final.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco teórico

2.1.1. Cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es uno de los principales cultivos comerciales en varios países tropicales, en América, 15 % de la producción mundial se concentra en el centro y sur del continente, donde Brasil y Ecuador son los mayores productores [10]. En el Ecuador, el cacao es un cultivo de interés económico para los agricultores de las provincias de Los Ríos

y del Guayas, cuyas almendras son de gran atractivo en los mercados internacionales por ser un producto de calidad denominado "fino de aroma" [11].

2.1.2. Clasificación Taxonómica del Theobroma cacao L

A continuación, se muestra la clasificación taxonómica del cacao

Tabla 1. Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Esterceiaceae
Género	Theobroma
Especie	Theobroma cacao

Fuente: Palencia y Mejía, 2000 [12].

2.1.3. Fenología Theobroma cacao L

Existen diferentes plantas tropicales pertenecientes al género *Theobroma cacao* se han reportado aproximadamente 22 especies, presenta importante significancia comercial, ya que es un cultivo permanente con periodo de vida de aproximadamente 40 años; crece entre los límites de 26° latitud norte y 26° latitud sur, temperatura media entre 25° y 29°C, son sensibles a temperaturas mayores a 32°C, se desarrolla en suelos no inundables, fértiles, ricos en materia orgánica, profundos y con buen drenaje [12].

2.1.4. Mucílagos

El mucílago se compone principalmente de polisacáridos y forma una cubierta gelatinosa alrededor de la diáspora, que absorbe y mantiene una cantidad considerable de agua debido a su naturaleza hidrófila, con la secreción de mucílago, tanto el peso de la semilla como el volumen de la misma aumentan significativamente, cuando se seca, el mucílago se vuelve rígido y pega la diáspora a la superficie sobre la que se asienta [13].

2.1.5. Mucílago de cacao

El mucílago de cacao tiene una consistencia viscosa que envuelve al cacao, es una sustancia vegetal la cual consta de una composición rica en polisacáridos y celulósicos con cantidad de azúcar igual que las gomas y pectinas [13]. En la tabla 2, se especifica la composición del mucílago de cacao.

Tabla 2. Composición del mucílago de cacao

Componentes	Antes de la fermentación
Agua	82-87 %
Alcohol etílico	-
Ácido acético	-
Sacarosa	12%
Pectinas	1-1,5%
Ácido cítrico	1-2%
pH	3,7

Fuente: García, M. entre otros, 2014 [14].

2.1.6. Semillas de cacao

Son grandes del tamaño de una almendra, color chocolate o purpúreo, de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo, no tiene albumen, están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco, de sabor dulce y acidulado, todo el volumen de la semilla en el interior está prácticamente ocupado por los 2 cotiledones del embrión, se les llama vulgarmente "habas" o "granos" de cacao, ricas en almidón, en proteínas, en materia grasa, lo cual les confiere un valor nutritivo real [13]. A continuación, se presenta en la tabla 3 y 4, el contenido de las semillas de cacao.

Tabla 3. Contenido de las semillas (cacao por cada 100g)

Calorías	456
Agua	3,6 mL
Proteína	12 g
Grasa	46,3 g
Carbohidratos (totales)	34,7 g
Fibra	8,6 g
Glucosa	8-13 g
Sucrosa	0,4-0,9 g
Calcio	106 mg
Fósforo	537 mg
Hierro	3,6 mg
Tiamina	0,17-0,24 mg
Riboflavina	0,14-0,41 mg
Niacina	1,7 mg
Ácido ascórbico	3,0 mg
Piridoxina	0,9 mg
Nicotiamida	2,1 mg

Fuente: García, M. entre otros, 2014 [14].

Tabla 4. Contenido de las semillas (cacao por cada 100g)

Acidopantoténico	1,35 mg
Histidina	0,04-0,08 g
Arginina	0,03-0,08 g
Treonina	0,14-0,84 g
Serina	0,88-1,99 g
Acido glutámico	1,02-1,77 g
Prolina	0,72-1,97 g
Glicina	0,09-0,35 g
Alamina	1,04-3,61 g
Valina	0,57-2,60 g
Lisina	0,08-0,56 g
Leucina	0,45-4,75 g
Isoleucina	0,56-1,68 g
Tirosina	0,57-1,27 g
Fenilalanina	0,56-3,36 g

Fuente: Cuellar, O, 2010 [15].

2.1.7. Variedades comunes del cacao

2.1.7.1. Criollos o Nacional

Es originario de Centroamérica, Colombia y Venezuela, se distingue por tener frutos de cáscara suave, de esta variedad se produce el cacao fino o de mejor calidad, este tipo de cacao posee un cotiledón de color entre marfil pardusco y castaño muy claro, con un olor de cacao dulce unido a un aroma delicado característico [13].

2.1.7.2. CCN51 (Colección Castro Naranjal 51)

El Ecuador en la actualidad produce cacao de fino de aroma y el CCN51, a partir de los años 70, se introduce el CCN51, de cuya variedad se estima existen unas 15,000 a 20,000 hectáreas, de las cuales el 70% está en plena producción, con rendimientos que superan la producción a las demás variedades de cacao [16]. Sus mazorcas son rojizas-moradas cuando tiernas y de color rojizo anaranjadas cuando maduras, este cacao es tolerante a las enfermedades, de alta productividad y calidad [14].

2.1.8. Levadura silvestre

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de organismos unicelulares, incluyendo especies patógenas para plantas y animales, así como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad [17].

La mayoría de las levaduras toleran un rango de pH entre 3 y 10, pero les resulta favorable un medio ligeramente ácido con un pH entre 4,5 a 6,5, son capaces de competir con la bacteria *Streptococcus bovis*, el principal productor de ácido láctico en el rumen, por azúcares solubles [18].

2.1.9. Levaduras utilizadas en fermentaciones alcohólicas

Las levaduras más estudiadas en el mundo son cepas provenientes de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (levadura panadera comercial), *Kluyveromyces fragilis* y *Candida utilis*, estas especies son consideradas como aptas para el consumo humano o GRAS (por las siglas en inglés de Generally Recognized As Safe) [18].

2.1.10. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae, es una levadura que constituye el grupo de microorganismos más íntimamente asociado al progreso y bienestar de la humanidad; su nombre deriva del vocablo *Saccharo* (azúcar), *myces* (hongo) y *cerevisiae* (cerveza), es una levadura heterótrofa, que obtiene la energía a partir de la glucosa y tiene una elevada capacidad fermentativa, es un producto del proceso de producción de alcohol, es una de las especies considerada como microorganismo GRAS, por lo que ha sido aprobada para su uso como aditivo alimentario [17]. En la tabla 5 se muestra la composición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

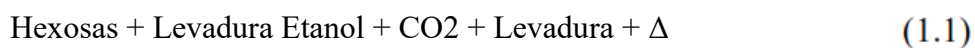
Tabla 5. Composición de *Saccharomyces cerevisiae*

Componentes	(%)
Polisacáridos	34,1
Trehalosa	5
Ácidos nucleicos y nucleótidos	10,8
Fosfolípidos	4,5
Triglicéridos	2,5
Esteroles	1
Ceniza	3,1
Proteína	39

Fuente: Cuellar, O, 2010 [15].

2.1.11. Proceso tecnológico para la producción de alcohol y levadura *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura de recuperación de cerveza la componen las células inviables deshidratadas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces ovarum* en algunos casos, esta levadura históricamente ha sido utilizada en la producción de alcohol con resultados satisfactorios, el proceso de producción de alcohol por vía fermentativa a través de la conversión de hexosas en etanol según la siguiente ecuación: [18].



2.1.12. Proceso fermentativo

El proceso de fermentación y su eficiencia para producir etanol depende en alto grado de la acción de levaduras y del sustrato utilizado, en algunos casos es necesario emplear complejos enzimáticos para hidrolizar el almidón y las proteínas residuales, permitiendo generar la fuente de carbono (hexosas) y de nitrógeno (aminoácidos), encaminada a garantizar la supervivencia de las levaduras tolerando concentraciones altas de alcohol producido y aumentando su productividad, en tal sentido será necesario emplear enzimas hidrolíticas como las amilasas y proteasas en este proceso y evaluar su efecto [18].

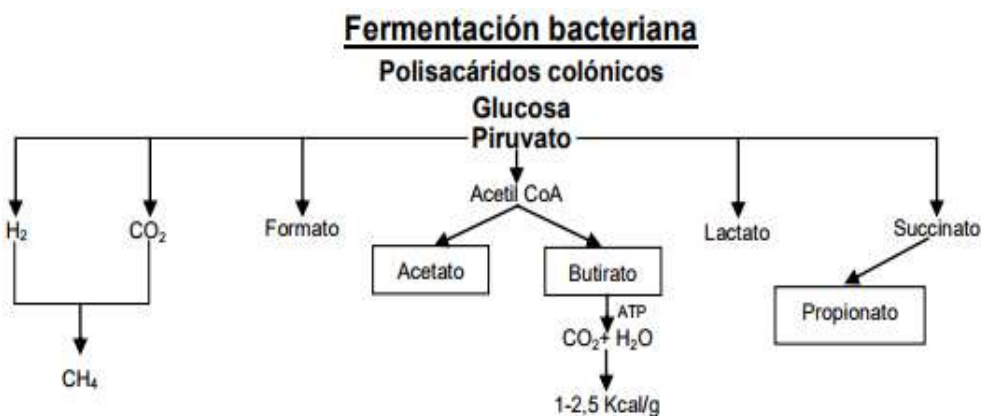
2.1.13. Fermentación

Es un proceso en el que se presentan cambios químicos y físicos en un sustrato de naturaleza orgánica ocuriente del resultado la acción de enzimática microbiana, es fácilmente denominado como una respiración en ausencia de oxígeno, es un proceso metabólico en donde los carbohidratos y otros compuestos relacionados son parcialmente oxidados, con liberación de energía en la ausencia de algunos electrones aceptores externos, este proceso anaerobio genera menor energía, que el proceso aerobio [13].

2.1.14. Fermentación bacteriana

El ácido pirúvico, es el intermediario principal en la degradación de la glucosa, su catabolismo involucra muchos mecanismos diferentes que forman una variedad de productos finales característicos de las fermentaciones bacterianas, los monosacáridos son catabolizados como resultado de la oxidación a ácido pirúvico, a través de una secuencia de pasos metabólicos por enzimas específicas, las bacterias pueden utilizar vías diferentes para formar ácido pirúvico y más de una vía puede ocurrir de manera simultánea en el mismo microorganismo [13]. En el grafico 1, se presenta el diagrama sobre el modo de acción de las bacterias en la fermentación.

Gráfico 1. Diagrama sobre el modo de acción de las bacterias en la fermentación [19].



Fuente: García, M. entre otros, 2014 [14].

A continuación, se presenta los productos finales característicos de la fermentación bacteriana

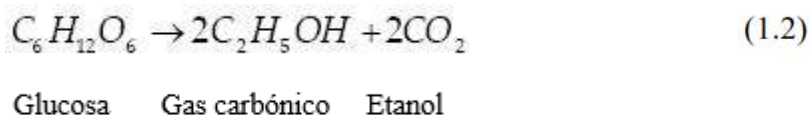
Tabla 6. Productos de la fermentación bacteriana

- a) Ácido láctico
- b) Ácido acético y fórmico
- c) Ácido láctico y alcohol etílico (etanol)
- d) Etanol
- e) Acetilmetilcarbonil
- f) Ácido succínico
- g) Acetona a alcohol isopropílico
- h) Ácido butírico (butanol)

Fuente: Cuellar, O, 2010 [15].

2.1.15. Fermentación alcohólica

Los azúcares son convertidos en alcohol, etanol y bioetanol [20]. En la fermentación existe actividad de algunos microorganismos [21].



Para que se activen las levaduras necesitan oxígeno en pequeñas cantidades, dentro del proceso fermentativo [22]. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es el género más común, aunque también existen estudios para producir alcohol con otros hongos y bacterias, como la *Zymomonas mobilis* [23].

2.1.16. Tipos de alcoholes

2.1.16.1. Metanol

El metanol es un líquido incoloro y volátil a temperatura ambiente, por sí mismo es inofensivo, pero sus metabolitos son tóxicos, su uso es muy habitual en la industria, laboratorios y en el propio hogar con alcohol de quemar o formando parte de productos comerciales, además, sirve como sustituto del etanol en bebidas alcohólicas [24].

2.1.16.2. Etanol

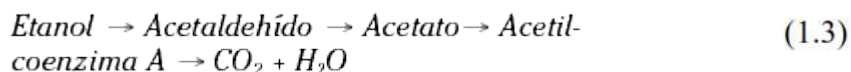
El etanol, de fórmula química CH_3CH_2OH , es el principal componente de las bebidas alcohólicas; éstas se obtienen por fermentación o destilación, según se trate de un

procedimiento u otro, se conseguirán bebidas de diferente graduación; así por ejemplo, vinos, cervezas o champán surgen a partir de la fermentación de frutas o granos, mientras que habrá que recurrir a la destilación para lograr ginebra, whisky, ron, entre otros [24].

2.1.16.2.1. Metabolismo del etanol

El etanol se convierte en acetaldehído por la acción de tres enzimas

- Alcohol deshidrogenasa (ADH). En no alcohólicos el 90-95% de la oxidación del etanol se realiza por medio del ADH, las mujeres tienen un nivel más bajo de actividad ADH gástrico que el hombre y esto contribuye a que las mujeres tengan valores más altos de alcoholemia que los hombres [24].
- Sistema oxidativo microsomal del etanol (MEOS), es un sistema enzimático dependiente del citocromo P-450 y contribuye con el 5-10% a la oxidación del etanol, pero su actividad aumenta significativamente hasta un 25% [24].
- Sistema catalasa-peroxidasa dependiente del peróxido de oxígeno, la contribución a la oxidación del etanol es mínimo [24].



2.1.16.3. Fomepizol ó 4-metilpirazol

El fomepizol es una sustancia que inhibe competitivamente la ADH, con una afinidad por ésta 80.000 veces superior a la del metanol y 8.000 veces superior a la del etanol, que no tiene efectos hepatotóxicos, su utilización está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para las intoxicaciones agudas por metanol y etilenglicol [24].

2.1.16.4. Etilenglicol

El etilenglicol es un alcohol de estructura similar al alcohol etílico, pero con la adición de un grupo hidroxilo en cada carbono, es un líquido incoloro, inodoro y no volátil, de amplio

uso industrial, tanto como intermedio de síntesis como por su tradicional uso como disolvente y típicamente como anticongelante [25].

2.1.16.5. Bioetanol

El bioetanol (alcohol etílico o alcohol carburante), cuya fórmula química es C_2H_5OH , se obtiene vía fermentativa utilizando diversas fuentes, como por ejemplo el material vegetal, esta contiene azúcares no libres (almidones y celulosa principalmente) que son fermentados por distintos microorganismos para la obtención de bioetanol, algunas de las principales materias primas para la producción de bioetanol son maíz, trigo, sorgo, remolacha azucarera, caña de azúcar, melaza, madera y residuos de podas entre otros [26].

2.2. Principales referencias bibliográficas

2.2.1. Influencia de la Temperatura en la fermentación alcohólica

Según el autor Santamaría, P y col [19]., en su publicación Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica indica que los problemas de la fermentación constituyen uno de los mayores inconvenientes de la vinificación, siendo todavía las fermentaciones incompletas un fenómeno que parece aumentar con la aplicación de un método de vinificación [19].

2.2.2. Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *Saccharomyces cerevisiae*

El autor Ferreyra, M. y col. 2009 [27]., en su investigación sobre la Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *Saccharomyces cerevisiae* indica que el vino se elabora a partir de uvas, por lo tanto es muy común la elaboración artesanal de bebidas o vinos [27].

2.2.3. Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación

La finalidad de este trabajo investigativo fue trabajar dentro de la etapa de fermentación para reducir las cualidades negativas del CCN51, como lo es la acidez, y astringencia, mediante la adición de enzimas, para el mejoramiento de las características sensoriales del cacao, se requirió del uso de dos enzimas: Polifenol oxidasa y una Proteasa comercial de origen fúngico, las cuales ayudaron a reducir la concentración de compuestos fenólicos disminuyendo el amargor y astringencia, y en potenciar el sabor a chocolate debido a la proteasa con actividad exopeptídica; todos estos cambios fueron notorios en las evaluaciones sensoriales que se realizaron frente a un tratamiento sin adición de enzimas [28].

2.2.4. Uso del exudado y placenta del cacao para la obtención de subproductos

El cultivo de cacao en la economía ecuatoriana representa un rubro importante, ya que es reconocido a nivel mundial por ser un producto de la más alta calidad, el presente trabajo pretende valorizar la posibilidad de producir una bebida de baja concentración alcohólica, lo que permitirá aprovechar estos subproductos que no son utilizadas por la industria, en este trabajo se determinaron los procesos necesarios para la obtención, para lo cual se trabajó con mazorcas de CCN51, las mismas que fueron procesadas para la obtención y estabilización del exudado y la placenta, subproductos a partir de los cuales se realizaron pruebas para obtener el néctar y la bebida alcohólica [29].

2.2.5. Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana

La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) es el principal desecho en la agroindustria de este fruto en Colombia, ya que representa un 10% por cada tonelada de semilla seca, en el presente estudio se obtuvo un extracto polar (etanol: agua 1:1) por dos métodos: ultrasonido y agitación magnética, se separó la fracción alcaloidal por extracción líquido – líquido con

cloroformo y la fracción fenólica con acetato de etilo, el análisis preliminar se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD) [15].

2.2.6. Análisis del Potencial Competitivo del Bioetanol en Colombia

La búsqueda de alternativas de producción y consumo energético requiere una mirada hacia la industria de los combustibles biológicos como el bioetanol que, como alternativa energética, permita superar los inconvenientes generados por los métodos tradicionales de producción y consumo, se realiza una evaluación de la industria del bioetanol como combustible alternativo y se expone qué tan atractiva o competitiva puede llegar a ser su industria en la actualidad, para lograr este propósito, se propone una evaluación de las fuerzas competitivas a un panel de expertos, usando escalas de Likert, para encontrar el potencial de la propuesta [30].

2.2.7. Producción de biodiesel y bioetanol: ¿Una alternativa sustentable a la crisis energética?

La presente contribución pretende dar una visión general de la situación energética actual y sugerir algunas alternativas sustentables de energía [31]. En primer lugar, se muestra una breve historia sobre las materias primas utilizadas para la producción de energía a través del tiempo, teniendo una alta dependencia de combustibles fósiles, ya que ha sido estimado que más del 90% de la energía consumida proviene de recursos no renovables como el petróleo, gas y carbón, también se menciona que el petróleo es sin duda la principal fuente de energía utilizada en la actualidad y por ende sus reservas se agotan inevitablemente [31].

2.2.8. Biocombustibles líquidos: procesos y tecnologías

Los numerosos problemas medioambientales creados por la acumulación de gases de efecto invernadero, la creciente demanda de energía y el agotamiento de la reserva de petróleo han impulsado el desarrollo de tecnologías sostenibles basadas en materias primas renovables como la biomasa [32]. En este sentido los biocombustibles (combustibles derivados de la

biomasa) pueden ayudar a reducir la emisión de gases contaminantes y, al mismo tiempo, cumplir con las demandas futuras de energía [32].

2.2.9. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos

En la actualidad, la biomasa lignocelulósicos y en especial los subproductos agroindustriales han dejado de ser productos de desecho-problema, para convertirse en materia prima potencial para diversos procesos tanto de tipo agrícola como industrial [33]. El presente documento, muestra una revisión del estado del arte de este tipo de materiales y su potencial de uso para biocombustibles (etanol), describiendo las características de las materias primas en cuestión, su estructura, las etapas (pre-tratamiento, hidrólisis, detoxificación y fermentación) y métodos que cita la literatura; al igual que los avances microbiológicos que han logrado para la incursión de los mismos en algunas de las etapas del proceso [33].

2.2.10. Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas

En el trabajo del que da cuenta el presente artículo se estudió la producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo utilizando células inmovilizadas en alginato de sodio, se compararon las fermentaciones en batch con células libres e inmovilizadas (*Saccharomyces cerevisiae*), utilizando medio estándar de fermentación y mosto de banano como sustrato [34]. Las fermentaciones con mosto de banano presentaron un incremento del 31% en la producción de etanol durante las primeras 14 horas de fermentación [34].

2.2.11. Impacto de la producción de bioetanol en el mercado del maíz

El mercado de maíz blanco en México, como país tomador de precios, se encuentra condicionado por las oscilaciones en los precios del maíz amarillo de su principal socio comercial, los Estados Unidos, dado que este último se encuentra en un proceso de industrialización del maíz para la producción de agro combustibles a base de etanol, genera una mayor competencia en el consumo del grano lo que propicia un déficit de la oferta,

incluso mundial, que conlleva al incremento de los precios normales del mismo, efecto que se transfiere al comercio internacional [35].

Para lograr este objetivo se diseña y presenta un modelo dinámico de sistemas con el cual se sistematiza el mercado del maíz, que permite analizar el impacto de la incorporación del nuevo sector demandante en el mercado nacional de maíz (el sector productor de etanol), así como sus efectos en los precios normales internacionales y nacionales [35].

2.2.12. Norma Técnica Ecuatoriana INEN 176:2006. Cacao en grano. Requisitos

Esta norma establece los requisitos de calidad que debe cumplir el cacao en grano beneficiado y los criterios que deben aplicarse para su clasificación, esta norma se aplica al cacao beneficiado, destinado para fines de comercialización interna y externa [36].

CAPÍTULO III
MÉTODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Localización

Los análisis fisicoquímicos y todas las muestras del bioetanol se efectuaron en los Laboratorios de Operaciones Unitarias, Laboratorio de Termología y Laboratorio de Biotecnología, de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo; situado en km 1 1/2 vía a Santo Domingo. En la tabla 7, se muestra los ejes de localización del Instituto Geográfico Militar.

Tabla 7. Localización

Longitud	79°27'
Latitud	01°06'
Altitud	73 msnm

Fuente: IGM (Instituto Geográfico Militar)

El bioetanol destilado fue elaborado con mucílago de cacao procedente de la Casa de Cacao de la ciudad de Quevedo, Vía- Valencia, provincia de Los Ríos, mientras que la levadura fue de marca comercial (Levadura seca *Saccharomyces cerevisiae*), en la tabla 8 se presenta la ubicación Geográfica de la Nueva Casa de Cacao S.A.

Tabla 8. Ubicación Geográfica La Nueva Casa de Cacao S.A

Ubicación Geográfica Campus La Nueva Casa de Cacao S. A	
Latitud	78°37'00"O
Longitud	0°56'00"S
T° media	19 a 37° C

Fuente: IGM (Instituto Geográfico Militar)

Se realizó los análisis correspondientes del presente proyecto de investigación en el Laboratorio de bromatología de la UNIVERSIDAD TECNICA ESTATAL DE QUEVEDO, ubicada en el kilómetro 1½ vía Quevedo–Santo Domingo. A continuación, se muestra la ubicación geográfica del Campus La María.

Tabla 9. Ubicación Geográfica Campus "La María"

Ubicación Geográfica Campus Finca Experimental "La María".	
Latitud	1° 1' 20,045"O
Longitud	79° 27' 37,450"S
T° media	25 a 30 °C
Altitud	76 m.s.n.m.

Fuente: IGM (Instituto Geográfico Militar)

3.2. Tipo de investigación

El tipo de investigación aplicada es exploratoria, porque no se ha desarrollado este tipo de investigación anteriormente, la misma que describe cada uno de los factores y su comportamiento en el desarrollo experimental para luego ser tratadas estadísticamente y determinar el mejor tratamiento.

3.2.1. Investigación de campo

Para realizar la investigación de campo se elaboró el bioetanol y se realizó los respectivos análisis fisicoquímicos, bromatológicos proximales, para posteriormente compararlos con los parámetros correspondientes que inciden en la calidad del bioetanol.

3.2.2. Investigación cuantitativa

Se ejecutó en el estudio y análisis de la realidad a través de diferentes procedimientos basados en la medición como fueron los datos del pH, acidez, grados alcohólicos y densidad que permitieron un mayor nivel de control, realizando los experimentos para obtener explicaciones contrastadas a partir de las hipótesis, los resultados de esta investigación se basaron en la estadística.

3.2.3. Investigación explicativa

Se utilizó con el fin de determinar las causas y consecuencias, de las variedades de cacao, los porcentajes de levadura y el tipo de materia prima, tuvieron en las características físicas, químicas y rendimiento del bioetanol destilado, para ello se utilizó el método experimental.

3.2.4. Investigación bibliográfica y documental

Para el desarrollo de la presente investigación se tomó como referencia las normativas nacionales e internacionales e investigaciones similares. Los datos descriptivos fueron proporcionados por los estudios similares y las normas, sustentando de manera real este estudio.

3.3. Métodos de investigación

Los métodos empleados dentro de la investigación fueron los siguientes: analítico, deductivo e inductivo

3.3.1. Método deductivo – inductivo

Utilizando los resultados que fueron obtenidos del diseño experimental que se aplicó en la investigación fue un AxBxC para la “Evaluación del proceso fermentativo del mucílago del cacao aplicando *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de bioetanol”. Aplicando los métodos deductivos e inductivos se realizó las conclusiones sobre las hipótesis planteadas de la investigación.

3.3.2. Método analítico de los análisis físicos y químicos

Para la “Evaluación del proceso fermentativo del mucílago del cacao aplicando *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de bioetanol” se desarrolló un seguimiento mediante análisis de °Brix, pH, acidez, rendimiento, turbidez, grados alcohólicos, densidad, calor específico.

3.3.4. Método estadístico

Se verificó de acuerdo al análisis de varianza (ADEVA), el cual determinó la variación total de los datos, alterando en fracciones significativas, aplicables a cada uno de los orígenes de variabilidad concurrentes y la diferenciación causal (aleatoria).

3.3.5. Metodología del experimento

El bioetanol destilado que fue elaborado mediante el proceso fermentativo del mucílago de dos variedades de cacao que se recolectaron tanto en semillas y líquido de la Casa de Cacao, el mucílago de cacao en la empresa, se encuentra en fermentadores de madera, se recolectó el líquido del cacao del conducto por donde es expulsado y desperdiciado, y la forma sólida fue una mezcla de semillas y baba de cacao (espuma). Al llegar la materia prima se le realizó análisis de pH y °Brix, para luego ser utilizada en el proceso fermentativo en 24 botellas de capacidad de 5 litros, se adicionó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a cada botella en proporciones de (0%, 0,01%, 0,05%) respectivamente, luego se coloca un mecanismo para que se produzca ausencia de oxígeno, este paso dura aproximadamente 5 días.

A continuación se procedió a destilar cada muestra en un destilador que se encuentra en el Laboratorio de Operaciones Unitarias, en este aparato se efectuó la separación de las sustancias que componen la mezcla, mediante vaporización y condensación, este proceso varía en función de la presión del destilador, dando como resultado etanol, a una temperatura de 70°C, durante aproximadamente 2 horas por cada muestra.

Una vez realizada la destilación, se realizó el llenado en envases de 500 ml por cada tratamiento estudiado, luego se ejecutaron las respectivas pruebas a cada muestra, los análisis físicos de: turbidez, densidad, calor específico, rendimiento y análisis químicos tenemos pH, °Brix, Acidez, Grados alcohólicos y poder de combustión: Este último, se lo creó destilando todas las muestras, obteniendo un solo ejemplar como mejor tratamiento, el etanol (10%), se mezcló con gasolina (90%), y se comprobó en un motor de mecánica de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, esa fue la última fase para el producto final Bioetanol obtenido del proceso fermentativo de mucílago de cacao.

3.4. Fuentes de recopilación de información

La información recopilada en este proyecto de investigación proviene un 85% de revistas indexadas (Redalyc, Scielo, Dialnet, entre otros), Normas INEN, NOM, libros y fichas tecnológicas con el fin de resguardar dicha exploración con antecedentes bibliográficos. El porcentaje restante se atribuye a información en la red; se utilizó tesis de grado e internet, como fuentes de información secundaria.

3.5. Diseño de la investigación

3.5.1. Diseño experimental del bioetanol destilado de mucílago de cacao

Se aplicó un modelo factorial AxB con 24 muestras, con 3 factores. Los análisis realizados a las muestras de bioetanol fueron: pH, °Brix, acidez, °GL, turbidez, densidad y rendimiento.

3.5.2. Factores de estudio

En esta investigación se utilizaron tres factores de estudios los cuáles son

El factor A; Tipos de cacao (CCN51 y Nacional)

El factor B; Tipos de levadura (al 0% - 0,01% - 0,05%)

El factor C; Tipo de materia prima (sólida y líquida)

A continuación, en la tabla 10, se muestra los factores de estudio que intervienen en la elaboración de bioetanol.

Tabla 10. Factores de estudio que intervienen en la elaboración de bioetanol

FACTORES DE ESTUDIO	SIMBOLOGÍA	DESCRIPCIÓN
A: Variedades de cacao	ao	CCN51
	a1	Nacional
	b0	0%
B: Porcentaje de levaduras	b1	0,01%
	b2	0,05%
	c0	Sólido
C: Tipo de materia prima	c1	Líquido

Elaborado por: Angulo, G. (2017).

3.5.3. Tratamientos

Las muestras son la miscelánea de los niveles de estudio que se utilizó en la elaboración de bioetanol con la combinación de variedades de cacao (Nacional, CCN51), porcentaje de levadura (0%, 0,01% y 0,05%) y tipo de materia prima (sólida y líquida). A continuación, la tabla 11, detalla la combinación de los tratamientos propuestos para la evaluación del proceso fermentativo.

Tabla 11. Combinación de los tratamientos propuestos para la evaluación del proceso fermentativo

N.º	SIMBOLOGÍA	DESCRIPCIÓN
1	a ₀ b ₀ c ₀	CCN51+ 0% + Sólido
2	a ₀ b ₀ c ₁	CCN51+ 0% + Líquido
3	a ₀ b ₁ c ₀	CCN51+ 0,01% + Sólido
4	a ₀ b ₁ c ₁	CCN51+ 0,01% + Líquido
5	a ₀ b ₂ c ₀	CCN51+ 0,05% + Sólido
6	a ₀ b ₂ c ₁	CCN51+ 0,05% + Líquido
7	a ₁ b ₀ c ₀	Nacional+ 0% + Sólido
8	a ₁ b ₀ c ₁	Nacional+ 0% + Líquido
9	a ₁ b ₁ c ₀	Nacional+ 0,01% + Sólido
10	a ₁ b ₁ c ₁	Nacional+ 0,01% + Líquido
11	a ₁ b ₂ c ₀	Nacional+ 0,05% + Sólido
12	a ₁ b ₂ c ₁	Nacional+ 0,05% + Líquido

Elaborado por: Angulo, G. (2017)

3.5.4. Análisis Estadísticos

A continuación, la tabla 12, muestra el esquema del análisis de varianza para la evaluación del proceso fermentativo del mucílago de cacao, aplicando *Saccharomyces cerevisiae* para producción de bioetanol. A continuación, se observa el esquema del análisis de varianza.

Tabla 12. Esquema del análisis de varianza para la evaluación del proceso fermentativo del mucílago de cacao, aplicando *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de bioetanol

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Réplica	2
Factor A (CCN51 y Nacional)	1
Factor B (0%, 0,01% y 0,05%)	1
Factor C (Tipo de materia prima)	1
AxB	1
AxC	1
BxC	1
AxBxC	1
Error Experimental	14
TOTAL	23

Elaborado por: Angulo, G. (2017).

3.6. Instrumentos de investigación

3.6.1. Manejo específico del experimento

Recepción: Se recolectó el mucílago de cacao tanto en semillas y líquido de la Casa de Cacao, ubicada a km² 1/2 vía Valencia junto a la exportadora Pedro Martinetti, el mucílago de cacao en la empresa se encuentra en fermentadores de madera, donde se escurre el cacao, que expulsa el mucílago que es desechado por una cañería, se recolectó el líquido del cacao y la forma sólida fue una mezcla de semillas y baba de cacao (espuma).

Análisis químicos: Se realiza análisis de pH y °Brix, a la materia prima utilizada para luego ser utilizada en el proceso fermentativo.

Inoculación: Se añade en cada muestra (0%, 0,01%, 0,05%) de porcentajes de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* en cada recipiente con la muestra se homogeniza para asegurarse que exista una adecuada distribución de la levadura silvestre, esto se realiza a una temperatura de 25°C.

Fermentación: El proceso de fermentación es anaeróbico, es decir, se produce en ausencia de oxígeno; colocando un mecanismo para controlar el proceso fermentativo de cada muestra, en esta fase se convierte los azúcares del mucílago de cacao en alcohol etílico. Se lo realiza en botellas de 5 litros por cada tratamiento estudiado a una temperatura de 25°C, el proceso de fermentación del mucílago con la levadura silvestre dura aproximadamente 5 días.

Destilación: Se realiza en un destilador del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, en este aparato se efectúa la separación de las sustancias que componen la mezcla, mediante vaporización y condensación, aprovechando los puntos de ebullición, el proceso varía en función de la presión, dado como resultado etanol, a una temperatura de 70°C , durante aproximadamente 2 horas por cada muestra.

Recolección de tratamientos: Una vez realizada la destilación, se realizó el llenado en los envases de 500 ml por cada tratamiento estudiado.

Análisis fisicoquímico: Luego de destilar las 24 muestras, se realizan los respectivos análisis a cada muestra, los análisis físicos de: turbidez, densidad, calor específico, rendimiento y análisis químicos tenemos pH, °Brix, Acidez, Grados alcohólicos.

Análisis de combustión: Este fue el último análisis realizado, se lo hizo destilando todas las muestras, obteniendo una sola muestra destilada como mejor tratamiento se efectuó este análisis combinando el etanol (10%) y gasolina (90%), comprobando en un motor de mecánica de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

3.6.2. Análisis físicos-químicos

3.6.2.1. Análisis químicos

Medición de pH. – En el Laboratorio de Operaciones Unitarias se tomó la medición de pH en un equipo “OAKLON” a la materia prima receptada, mientras que en el laboratorio de Bromatología se realizó en un equipo marca “OHAUS”, a las muestras de etanol; en ambos equipos se procedió a introducir el electrodo dentro de cada botella con la muestra líquida del producto y se empleó la muestra de etanol directamente para llevar a cabo la medición.

°Brix. - En el Laboratorio de Operaciones Unitarias se tomó la medición de los grados Brix en un Brixómetro “ATAGO” a la materia prima receptada, se coloca unas dos gotas de la muestra y posteriormente se observa el porcentaje que marca el equipo. En el laboratorio de Bromatología se realizó en un equipo marca “POCKET”, a las muestras de etanol, se procedió a encender el Refractómetro luego colocar una gota de cada prototipo en el aparato y presionar “start” para que automáticamente lea y determine el valor de °Brix en cada tratamiento.

Acidez. – Se efectuó por titulación mediante consumo de NaOH (Hidróxido de Sodio) a 0,1 de Normalidad en una muestra de 10 ml de muestra (etanol), como indicador se utilizó (2-3) gotas de C₂₀H₁₄O₄ (Fenolftaleína o colorante) y se comienza a titular (dejar caer gota a gota del agente titulante sobre el titilado) hasta obtener un ligero vire a rosa. Si es muy fuerte el color (fucsia), la titulación ha fracasado.

Grados alcohólicos. – Se realizó en un equipo llamado Alcoholímetro, se procedió a medir 90ml por cada muestra en una probeta de 100ml, para luego introducir el alcoholímetro en la sustancia y girar el equipo de tal manera que al detenerse poder leer el nivel de grado alcohólico que tiene cada muestra de etanol. Al mejor tratamiento que se obtuvo, se le tomó los °GL en un equipo “AQUEOUS LAB”, un Portable Refractometer, de la siguiente forma: se coloca (1-2 gotas) en el aparato y se procede a visualizar el valor obtenido.

3.6.2.2. Análisis físicos

Densidad. - Para determinar la densidad de un líquido (etanol) con el método del picnómetro, solamente se necesita la masa del mismo en tres situaciones diferentes. Todas las masas deben determinarse en balanza analítica y con la tapa. Primero se pesa el picnómetro vacío y se anota su masa. Luego se llena el picnómetro con agua y se anota su masa. Después se llena el picnómetro con la disolución etanol y se escribe su masa. Luego con estos 3 datos por cada muestra se procede a colocar en la fórmula, y determinar el valor obtenido de cada tratamiento.

Turbidez. – Este análisis se lo realiza en un equipo “HACH TURBIDIMETER”, que arroja los valores en NTU (Unidad Nefelométrica de Turbidez). Se inicia encendiendo el equipo, el cual consta de un recipiente que se llena con 30ml por cada muestra, después se lo introduce al equipo de tal manera que coincida con la rejilla del equipo, se continúa a presionar “enter” y se espera 60 segundos y la máquina automáticamente nos brinda el nivel de turbidez del tratamiento.

Calor específico. -En una probeta se mide 160 ml de muestra y se coloca en el equipo, el cual se lo tapa, y encima de él se encuentra un termómetro el cual sube su temperatura de acuerdo al calor de cada muestra que se mueve constantemente con un agitador, la temperatura debe comenzar en 25°C y llegar máximo a 60°C, reacciona la solución, a 6 voltios, y 1 amperio; que funciona a corriente.

Los valores que nos da esta máquina la determinamos por un cronómetro, que inicia en 0 segundos y termina aproximadamente en 1 hora, además se debe parar cada vez que transcurra 3°C y así sucesivamente hasta que llegue a 60°C. Después de eso se determina el calor específico por medio de una fórmula física, la cual necesita además la masa de la sustancia, y la pendiente por cada muestra.

Rendimiento. – Se lo realizó en 1 ejemplar de las 24 muestras de etanol, es decir al mejor tratamiento, midiendo en una probeta de 100ml. Se efectuó en la estancia de Suelo y Agua, perteneciente al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Combustión. - El poder de combustión se lo determinó destilando todas las muestras, obteniendo una sola muestra como mejor tratamiento, el cual tuvo 70°GL, se efectuó este análisis combinando el etanol con gasolina y comprobando en un motor de mecánica de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

3.7. Tratamiento de los datos

La tabulación de los datos se realizó utilizando los paquetes estadísticos, InfoStat y Stat Graphics, los datos obtenidos de los análisis realizados a los tratamientos se aplicó ANOVA o análisis de varianza. Se estudiaron los métodos combinados para la determinación de pH, acidez, brix, grados alcohólicos, densidad, turbidez, rendimiento, calor específico del bioetanol.

3.8. Diseño experimental

Dos niveles en factor A y C y tres niveles en el factor B, en el estudio: Factor A (CCN51 y Nacional), Factor B (0%, 0,01% y 0,05%) y Factor C (Tipo de materia prima). Se determinó el contenido de pH, brix, acidez, turbidez, rendimiento, calor específico, densidad, grados alcohólicos; del bioetanol.

Número de tratamientos: 12

Número de repeticiones: 2

Unidades experimentales: 24

3.9. Recursos humanos y materiales

En esta investigación se utilizaron materiales y equipos del laboratorio de Bromatología. En la siguiente tabla se presenta los materiales empleados para la realización de la investigación

Tabla 13. Materiales

Computadora	1
Hojas A4 (Resmas)	3
Lapicero	3
Cuaderno	1
Cámara	1
Normas INEN (Folleto)	1
Impresora	1
Memoria Digital	1

Elaborado por: Angulo, G. (2017).

3.10. Materiales y reactivos

3.10.1. Materia prima e insumos para la fermentación del mucílago de cacao

A continuación, se muestra la materia prima e insumos para realización de la investigación

Tabla 14. Materia prima e insumos

N.	Descripción	Cantidad
1	Mucílago de cacao (semilla y baba)	30 lt c/u
2	Levadura seca (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	250 g
3	Globos	24 unidades
4	Botellas de 5 litros y de 500 cm ³	48 unidades

Elaborado por: Angulo, G. (2017).

3.10.2. Aparatos y Materiales del proyecto de investigación

En la tabla 15, se muestra detalladamente los aparatos utilizados para la obtención de bioetanol a partir de mucílago de cacao

Tabla 15. Aparatos para la obtención de bioetanol a partir de mucílago de cacao

Cantidad	Descripción	Capacidad
1	Balanza digital	5000 g
3	Ollas	5 L
12	Botellas plásticas	5 L – 500 cm ³
1	Destilador	-
1	Etiquetas adhesivas	-
1	Lapicero	-
1	Tanque de gas	-
2	Jarras	-
2	Embudo	-
24	Globos	-
1	Balde	-

Elaborado por: Angulo, G. (2017)

En la tabla 16, se muestra los materiales de laboratorio utilizados para la obtención de bioetanol a partir de mucílago de cacao

Cantidad	Descripción	Capacidad
2	Vasos de precipitación	500 cm ³
4	Matraces	-
1	Termómetro	300 °C
6	Matraz Erlenmeyer	500 cm ³
1	Picnómetro	-
1	Alcoholímetro	0 – 90 °GL
1	Potenciómetro	1.25 L
1	Refractómetro	0 – 93 °Brix
1	Probeta	100 cm ³ - 10 cm ³
2	Pinzas metálicas	-

Tabla 16. Materiales de laboratorio

1	Fenolftaleína (Hidróxido de sodio 0,1N)	-
---	---	---

Elaborado por: Angulo, G. (2017)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Resultados del Análisis de Varianza

Recopilación de los análisis de los 3 factores (A, B, C), y sus respectivas diferencias significativas. En las tablas (18 - 22) que se encuentran a continuación, se presentan los análisis de varianza de las variables físico- químico de estudio.

Tabla 17. Análisis de Varianza de °Brix (%), suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma Cuadrados	de	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES						
Replicas	0,201667		1	0,201667	0,01	0,9277
EFECTOS PRINCIPALES						
Factor A	118,815		1	118,815	5,08	0,0456
Factor B	153,948		2	76,9738	3,29	0,0759
Factor C	15,36		1	15,36	0,66	0,4350
INTERACCIONES						
AB	16,9275		2	8,46375	0,36	0,7044
AC	0,666667		1	0,666667	0,03	0,8690
BC	12,4975		2	6,24875	0,27	0,7704
ABC	53,1408		2	26,5704	1,14	0,3561
RESIDUOS	257,348		11	23,3953		
TOTAL (CORREGIDO)	628,905		23			

Nivel de confianza $p < 0.05$

Coefficiente de variación 9,72

Elaborado por Angulo, G (2017)

Interpretación: Esta tabla demuestra los valores de °Brix, y muestra diferencia

significativa entre los niveles del factor A (variedades de cacao a0 – a1), por lo cual, se empleará una prueba de significación (Tukey $p < 0.05$) y se obtiene diferencia entre las medias de los niveles de tratamientos, mientras que en el factor A, interacción AxB, y réplicas no se observó discrepancia significativa.

En la tabla 18 que se encuentra a continuación, se muestra el análisis de varianza de acidez:

Tabla 18. Análisis de Varianza en Acidez (%), suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replicas	299,839	1	299,839	1,45	0,2539
EFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	35,9415	1	35,9415	0,17	0,6848
Factor B	219,214	2	109,607	0,53	0,6030
Factor C	167,218	1	167,218	0,81	0,3879
INTERACCIONES					
AB	1913,32	2	956,658	4,62	0,0349
AC	826,379	1	826,379	3,99	0,0710
BC	928,81	2	464,405	2,24	0,1522
ABC	224,38	2	112,19	0,54	0,5962
RESIDUOS	2275,91	11	206,901		
TOTAL (CORREGIDO)	6891,01	23			

Nivel de confianza $p < 0.05$

Coefficiente de variación 21,62

Elaborado por Angulo, G (2017)

Interpretación: La tabla 18, demuestra los datos de acidez titulable, en el que se halla diferencia significativa en la interacción AxB, por lo cual es necesario efectuar una prueba de significación (Tukey $p < 0.05$).

En la tabla 19 que se encuentra a continuación, se detalla el análisis de varianza de grados alcohólicos:

Tabla 19. Análisis de Varianza para Grados alcohólicos, suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replicas	0,0416667	1	0,0416667	0,00	0,9588
EFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	15,0417	1	15,0417	1,01	0,3374
Factor B	140,333	2	70,1667	4,69	0,0336
Factor C	2,04167	1	2,04167	0,14	0,7187
INTERACCIONES					
AB	58,3333	2	29,1667	1,95	0,1883
AC	0,375	1	0,375	0,03	0,8770
BC	2,33333	2	1,16667	0,08	0,9254
ABC	43,0	2	21,5	1,44	0,2787
RESIDUOS	164,458	11	14,9508		
TOTAL (CORREGIDO)	425,958	23			

Nivel de confianza $p < 0.05$
 Coeficiente de variación 7,61
 Elaborado por Angulo, G (2017)

Interpretación: La tabla 19, se puede apreciar los valores de grados alcohólicos y establece diferencia significativa en los niveles del factor B (porcentaje de levadura), por lo tanto; se determinará una prueba de significación para establecer diferencia entre las medias de los tratamientos.

En la tabla 20 que se encuentra a continuación, se modela el análisis de varianza para turbidez:

Tabla 20. Análisis de Varianza para Turbidez (NTU), suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replicas	10,7589	1	10,7589	2,98	0,1123
EFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	15,1003	1	15,1003	4,18	0,0656
Factor B	83,7009	2	41,8504	11,59	0,0020
Factor C	7,45824	1	7,45824	2,06	0,1786
INTERACCIONES					
AB	16,2128	2	8,10641	2,24	0,1523
AC	17,9176	1	17,9176	4,96	0,0478
BC	91,4005	2	45,7002	12,65	0,0014
ABC	26,0732	2	13,0366	3,61	0,0624
RESIDUOS	39,7328	11	3,61207		
TOTAL (CORREGIDO)	308,355	23			

Nivel de confianza $p < 0.05$
 Coeficiente de variación: 49,14
 Elaborado por: Angulo, G. (2017).

Interpretación: La tabla 20, se aprecia los datos de turbidez, en el que se halló diferencia significativa en el factor B, interacción AxC y BxC, a excepción de los componentes A y C y las réplicas donde no concurrió diferencia, por lo tanto, se estableció una prueba de significación para crear diferencia entre las medias de los niveles.

En la tabla 21 que se encuentra a continuación, se muestra el análisis de varianza para rendimiento:

Tabla 21. Análisis de Varianza para Rendimiento (mL), suma de cuadrados tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replicas	1751,04	1	1751,04	0,35	0,5643
EFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	9,375	1	9,375	0,00	0,9661
Factor B	5908,33	2	2954,17	0,60	0,5678
Factor C	21301,0	1	21301,0	4,30	0,0624
INTERACCIONES					
AB	4725,0	2	2362,5	0,48	0,6331
AC	13776,0	1	13776,0	2,78	0,1236
BC	42408,3	2	21204,2	4,28	0,0422
ABC	17858,3	2	8929,17	1,80	0,2104
RESIDUOS	54511,5	11	4955,59		
TOTAL (CORREGIDO)	162249,	23			

Nivel de confianza $p < 0.05$

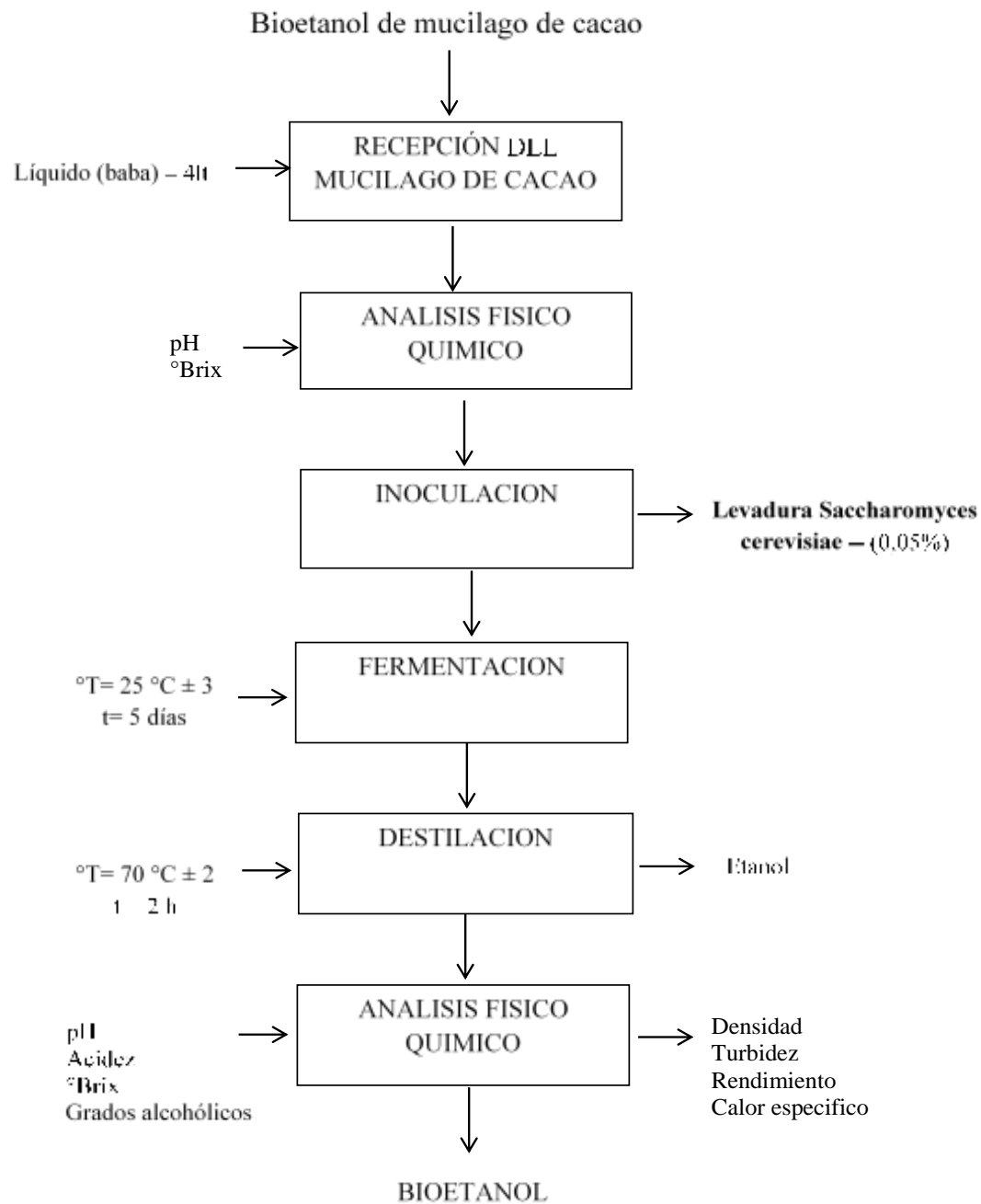
Coefficiente de variación 17,01

Elaborado por Angulo, G (2017)

Interpretación: En esta tabla se observa los valores de rendimiento y establece diferencia en la interacción BxC, por lo cual se establecerá un ensayo de significación para establecer discrepancia en los niveles de los tratamientos, con relación a cada factor A, B y C e interacciones AxB, AxC, AxBxC.

4.1.2. Resultados con respecto a los tres tipos de factores estudiados

A continuación, se muestra el modelo del proceso de elaboración del bioetanol, que determina que el tratamiento que mostró mejores resultados en comparación con los otros métodos asimilados, es el tratamiento T6= (CCN51+Levadura al 0,05%+ Líquido) por presentar pH, °Brix, acidez, °GL, turbidez, calor específico, densidad y rendimiento óptimo.



Rendimiento

$$\% R = \frac{P_F}{P_I} \times 100\%$$

$$\% R = \frac{470}{4,004 \text{ g}} \times 100\%$$

$$\% R = 11,73$$

Peso de insumos

Materia prima (líquido) = 4,000 g

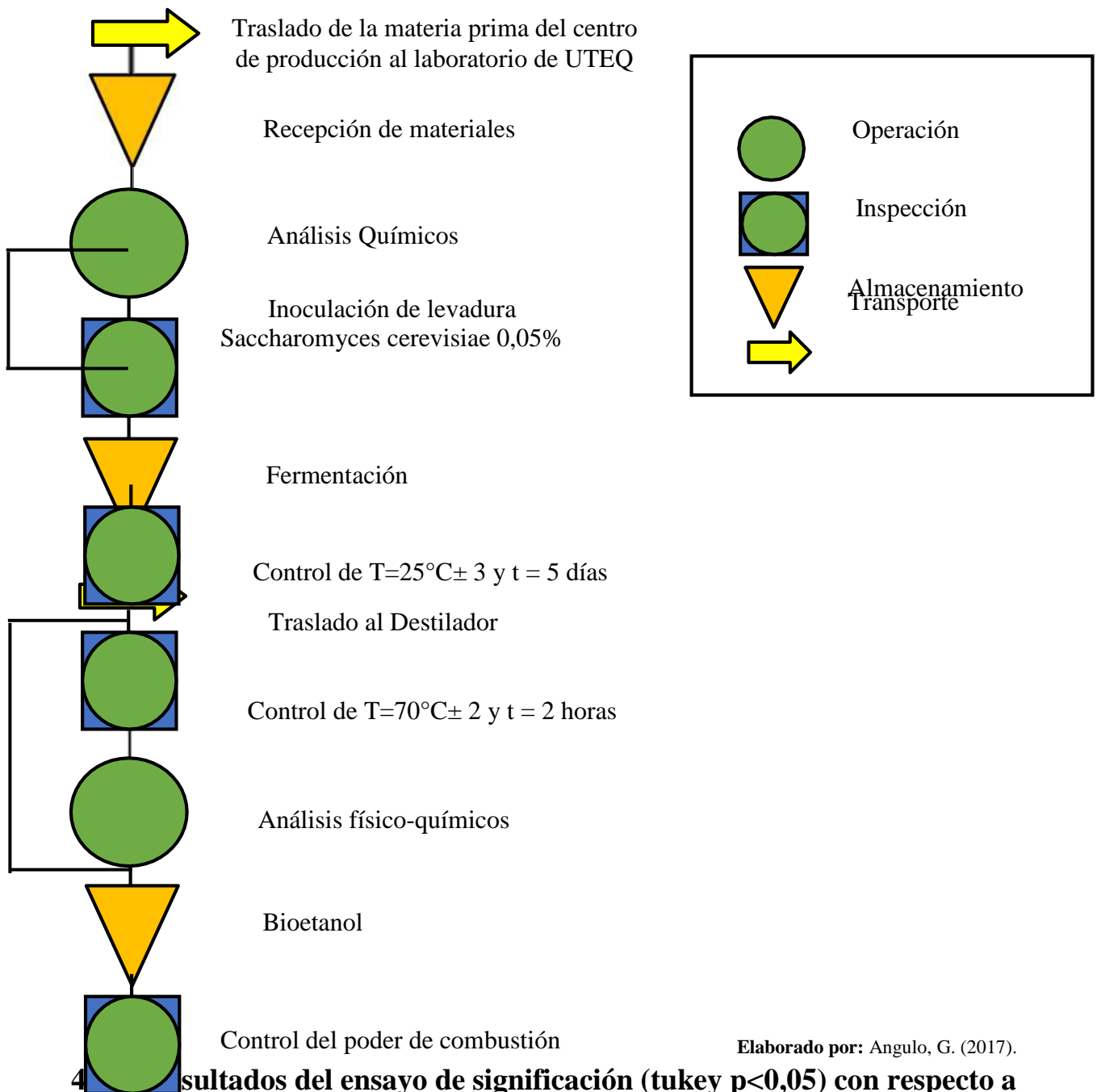
Levadura = 4 g

P. Total = 4,004 g

Elaborado por: Angulo, G. (2017).

4.1.3. Flujograma de proceso de la obtención de bioetanol a partir de mucílago de cacao

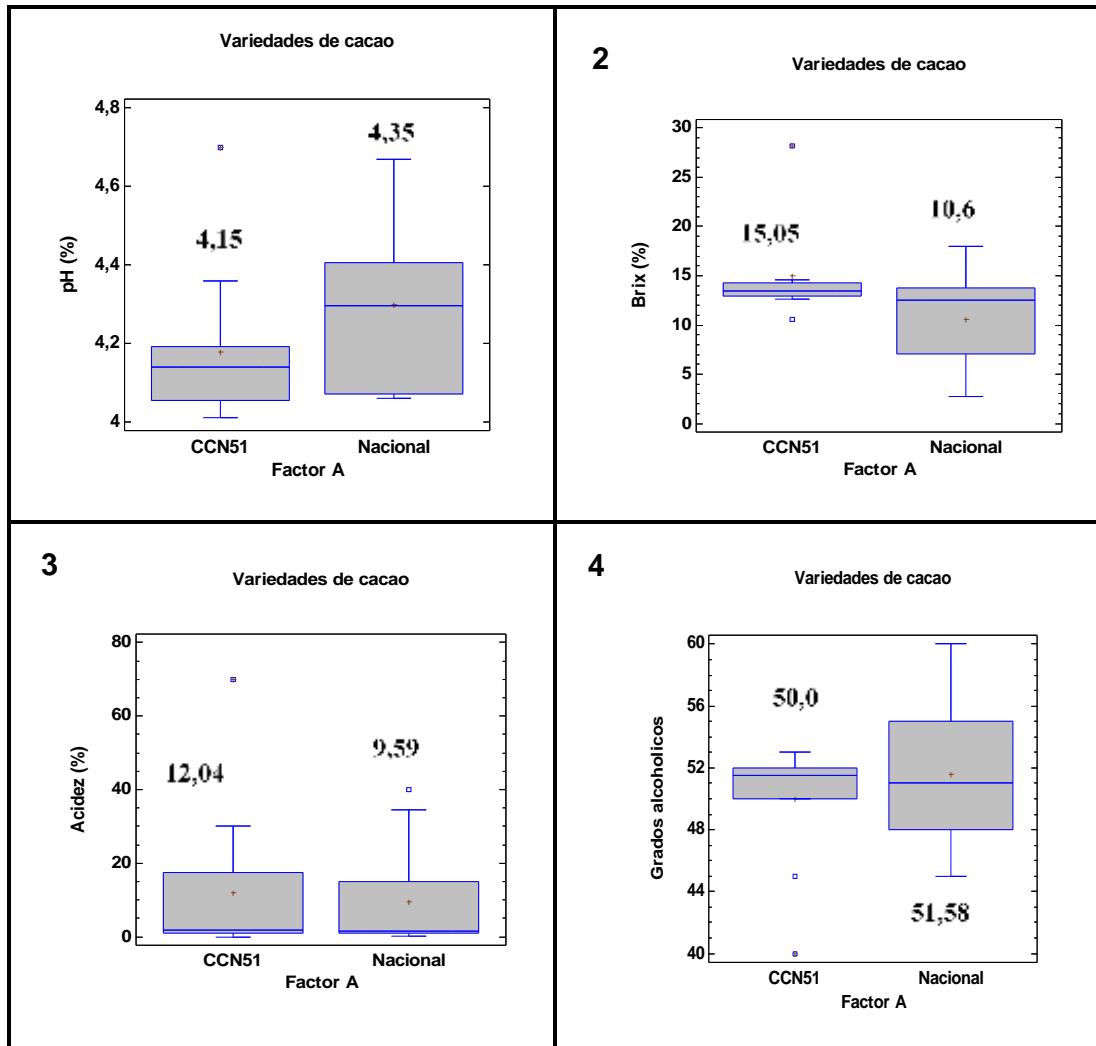
A continuación, se muestra el diagrama de flujo del proceso de obtención de bioetanol a partir de mucílago de cacao:



4. Resultados del ensayo de significación (tukey $p < 0,05$) con respecto a los Análisis Físicos y Químicos, de acuerdo con los niveles de estudio

4.1.4.1. Determinación del tipo de variedad de cacao, del que mayor rendimiento se obtenga de biocombustible. Resultados del factor A.

Gráfico 2. Resultados de las oposiciones entre Nacional y CCN51 de la cata de significación tukey. 1.pH(DS); 2. Brix (DS); 3. Acidez titulable (DS); 4. Grados alcohólicos (DS)



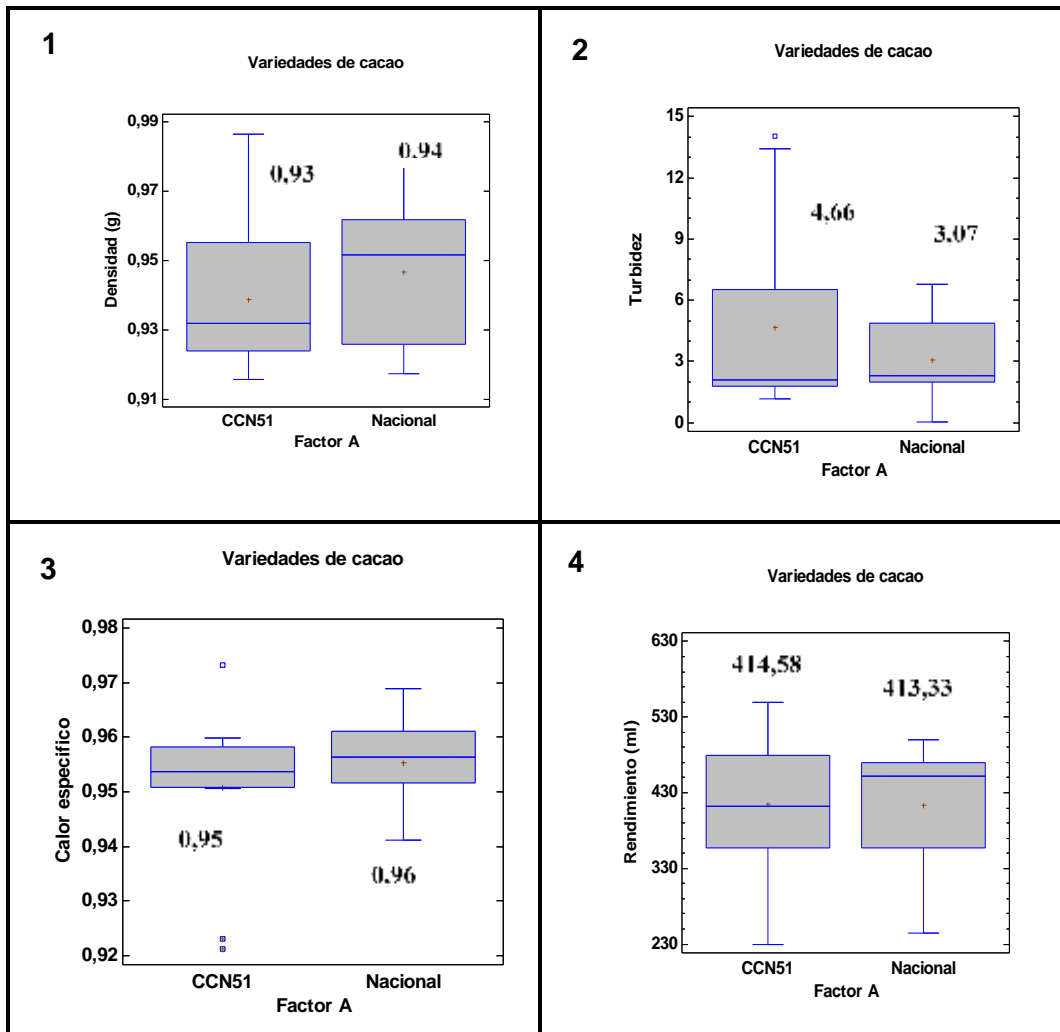
Elaborado por: Angulo, G. (2017).

Interpretación: En el gráfico 1, se aprecia la diferencia significativa para pH con una

cantidad superior de 4,35 en a_0 = (Nacional), mientras a_1 = (CCN51) obtuvo un valor de 4,15. Con respecto a °Brix el que contiene mayor cantidad de sólidos solubles es a_1 = (CCN51) con 15,05, en a_0 = (Nacional) con 10,06. En relación a la acidez titulable se observó el valor más alto en a_1 = (CCN51) de 12,4, y en a_0 = (Nacional) el valor fue de 9,59, en grados alcohólicos se encontró que a_0 = (Nacional) presentó un alto porcentaje de 51,58 y a_1 = (CCN51) 50,0.

4.1.4.2. Determinación del tipo de variedad de cacao, del que mayor rendimiento se obtenga de biocombustible. Resultados del factor A.

Gráfico 3. Resultados del contraste de medias de Nacional y CCN51 en el experimento de significación Tukey ($p < 0.05$). 1. Densidad (DS); 2. Turbidez (DS); 3. Calor específico (DS); 4. Rendimiento (DS).

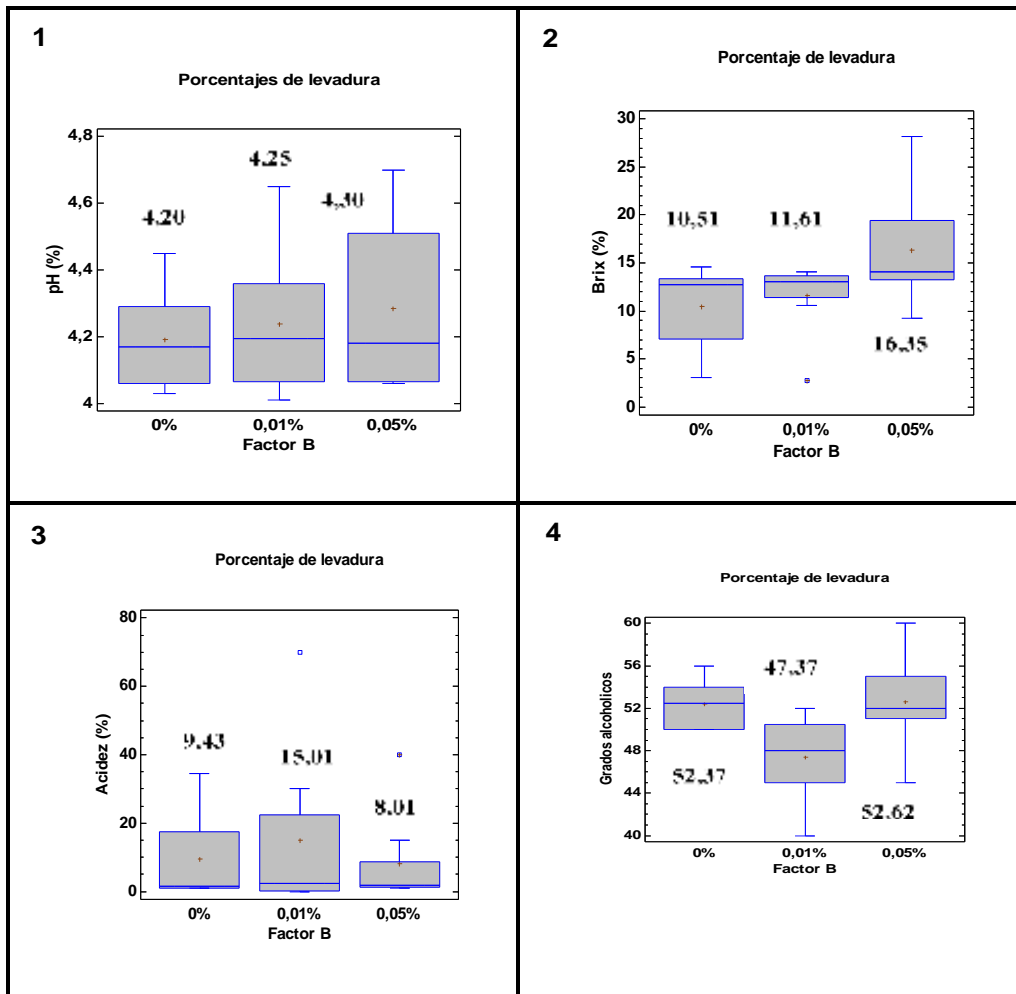


Elaborado por: Angulo, G. (2017).

Interpretación: En el gráfico 2 se observa claramente la diferencia significativa en densidad con mayor valor en $a_0 =$ (Nacional) con 0,94, mientras $a_1 =$ (CCN51) obtuvo 0,93, en turbidez se encontró un porcentaje superior de 4,66 que corresponde $a_1 =$ (CCN51), en $a_0 =$ (Nacional) fue 3,07, el calor específico presentó el mayor valor en $a_0 =$ (Nacional) con 0,96, a diferencia de $a_1 =$ (CCN51) el valor fue de 0,95, el rendimiento en $a_1 =$ (CCN51) alcanzó un valor de 414,58 y $a_0 =$ (Nacional) 413,33.

4.1.4.3. Establecimiento de los porcentajes de levadura, en el proceso fermentativo al (0%, 0,01% y 0,05%). Resultados del Factor B.

Gráfico 4. Resultados de las diferencias de las proporciones de levadura 0%, 0,01 y 0,05% en la prueba de significación Tukey. 1. pH (DS); 2. Brix (DS); 3. Acidez Titulable (DS); 4. Grados alcohólicos (DS)



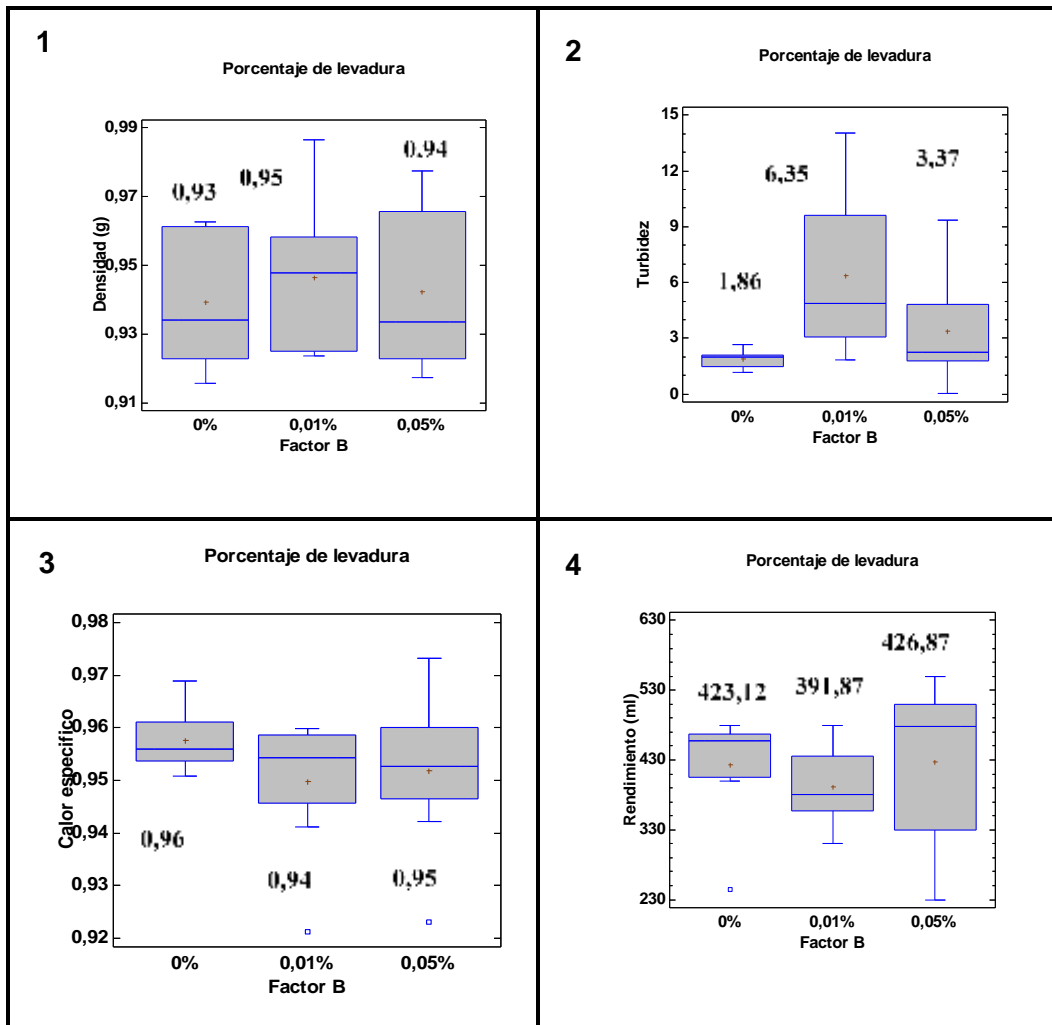
Elaborado por Angulo, G (2017)

Interpretación: Este gráfico, otorga una estimación diferencial en pH con un de 4,30 en

$b_1 = (0,01\%)$, y $b_0 = (0\%)$ un valor de 4,20, en brix se indicó el mayor porcentaje en $b_2 = (0,05\%)$ con 16,35, mientras $b_0 = (0\%)$ una cantidad de 10,51, la acidez presentó mayor valor en $b_1 = (0,01\%)$ con 15,01, $b_2 = (0,05\%)$ un valor de 8,01, en °GL se encontró que $b_2 = (0,05\%)$ obtuvo un valor de 52,62 y $b_1 = (0,01\%)$ indicó un valor de 47,37.

4.1.4.4. Establecimiento de los porcentajes de levadura, en el proceso fermentativo al (0%, 0,01% y 0,05%). Resultados del Factor B.

Gráfico 5. Resultados de las diferencias en los porcentajes de 0%, 0,01 y 0,05%, realizado un ensayo de significación Tukey ($p < 0.05$). 1. Densidad (DS); 2. Turbidez (DS); 3. Calor específico (DS); 4. Rendimiento (DS).

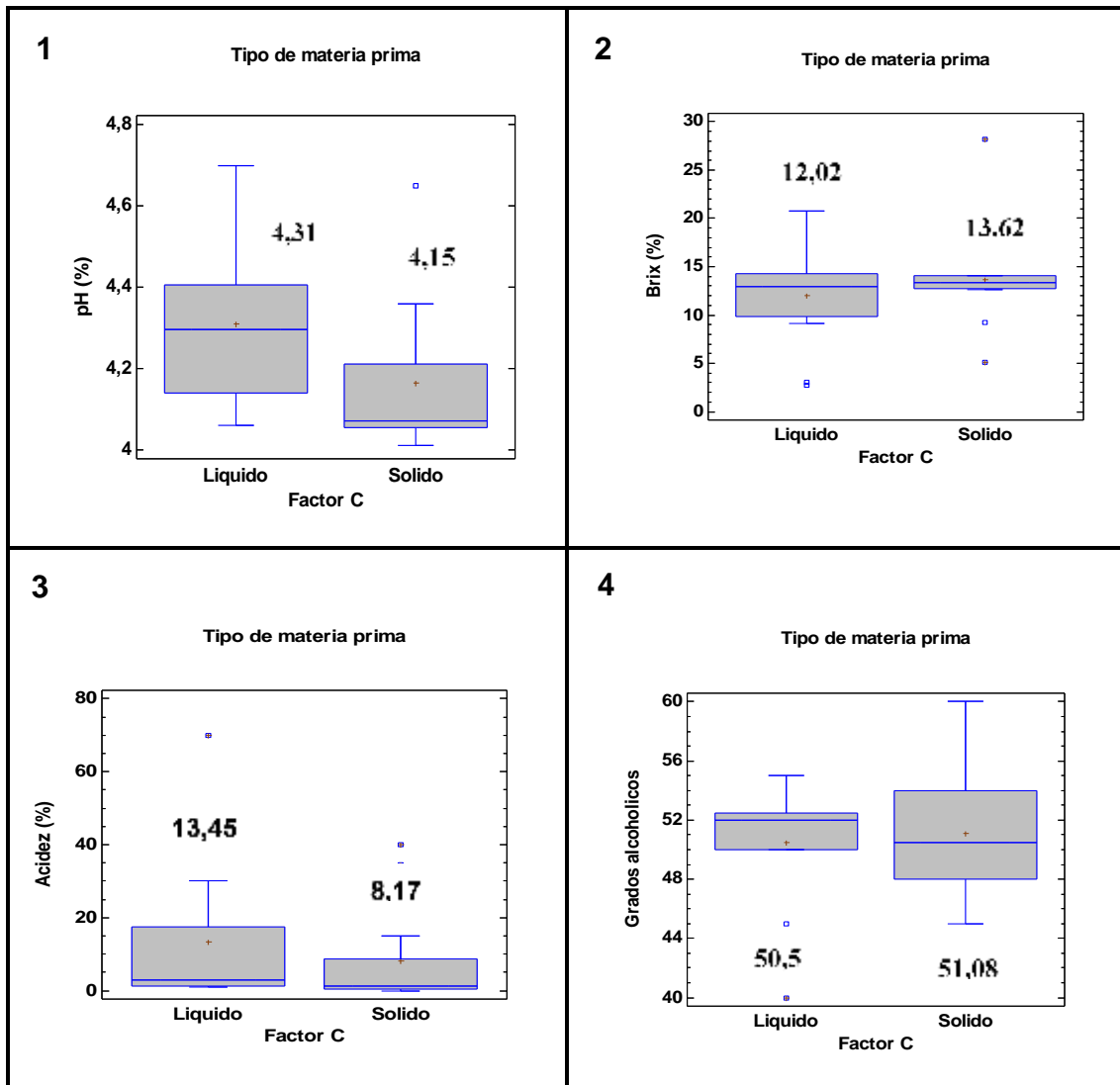


Elaborado por Angulo, G (2017)

Interpretación: El gráfico 4 exhibe diferencia en densidad, con valores de $b_1 = (0,01\%)$ con 0,95, a diferencia de $b_0 = (0\%)$ que fue 0,93, en turbidez se halló el valor más alto de 6,35 que corresponde $b_1 = (0,01\%)$, y el valor más bajo en $b_0 = (0\%)$, un valor de 1,86; $b_0 = (0\%)$ presentó un mayor valor de 0,96 y $b_2 = (0,05\%)$ obtuvo un valor menor de 0,95, en calor específico y en rendimiento se estableció que $b_2 = (0,05\%)$ obtuvo un mayor valor con 426,87 y $b_1 = (0,01\%)$ un valor de 391,87.

4.1.4.5. Evaluación del proceso fermentativo del cacao en forma sólida y en forma líquida. Resultados del Factor C (tipo de materia prima)

Gráfico 6. Resultados de los contrastes entre sólido y líquido de la cata de significación Tukey ($p < 0.05$). 1. pH (DS); 2. Brix (DS); 3. Acidez Titulable (DS); 4. Grados alcohólicos (DS)

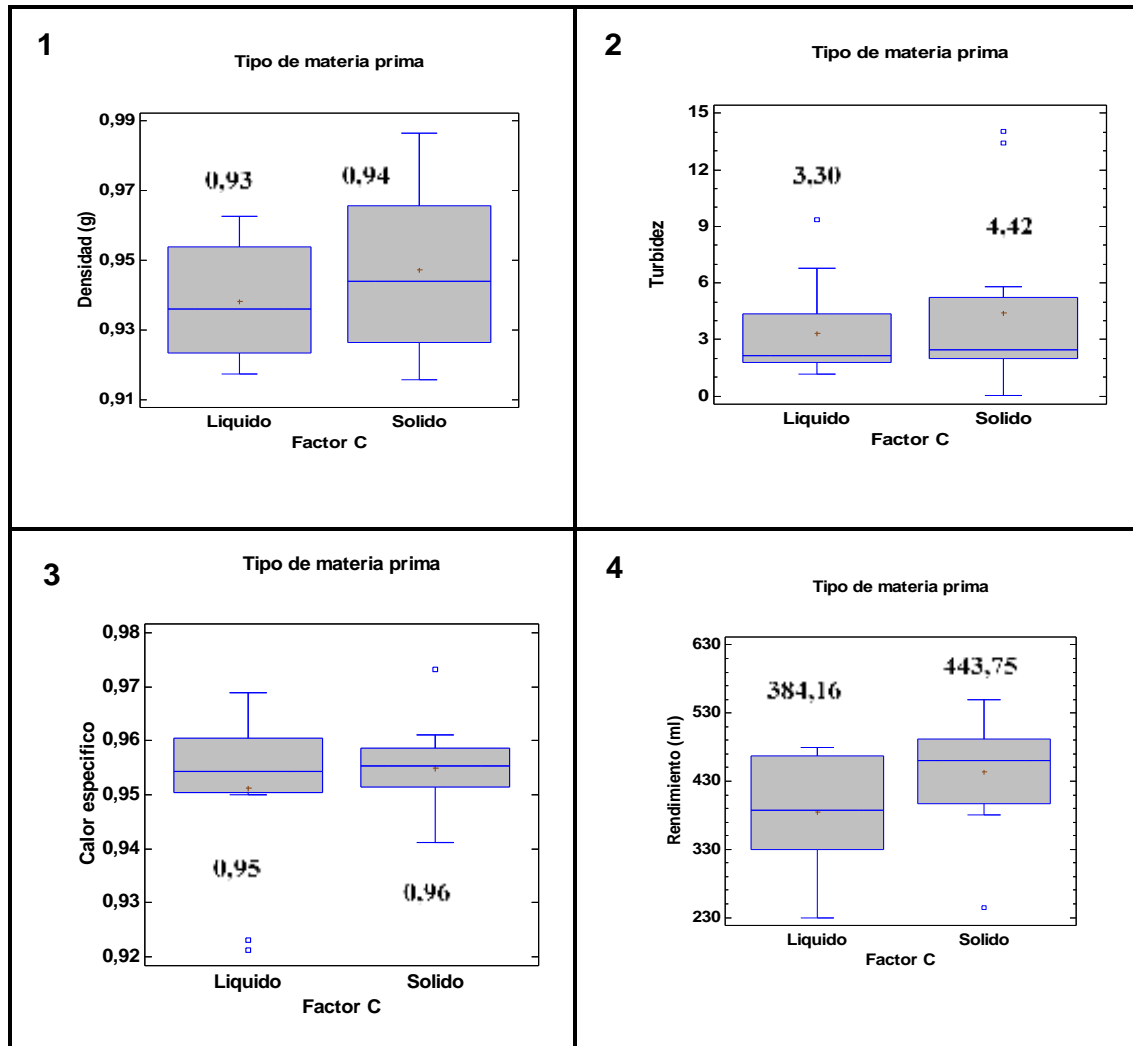


Elaborado por: Angulo, G. (2017).

Interpretación: En el gráfico 5 se observa la diferencia significativa el pH presentó un valor mayor de 4,31 en c_1 = (liquido), mientras c_0 = (solido) una cantidad de 4,15. Con respecto a los °Brix, se encontró el valor más alto de 13,62 que corresponde c_0 = (solido), y el valor más bajo en c_1 = (liquido), un valor de 12,02; en acidez c_1 = (liquido) presentó un valor alto de 13,45, a diferencia de c_0 = (solido), con un valor de 8,17 y °GL se estableció que c_0 = (solido) obtuvo un mayor valor con 51,08 y c_1 = (liquido) un valor de 50,5.

4.1.4.6. Evaluación del proceso fermentativo del cacao en forma sólida y en forma líquida. Resultados del Factor C (tipo de materia prima)

Gráfico 7. Resultados entre sólido y líquido de la prueba Tukey. 1. Densidad (DS); 2. Turbidez (DS); 3. Calor específico (DS); 4. Rendimiento (DS)



Elaborado por: Angulo, G. (2017).

Interpretación: El gráfico 6 muestra diferencia significativa en densidad con mayor cantidad en c_0 (sólido) con 0,94, y c_1 (líquido) presentó 0,93, la turbidez indica más en c_0 (sólido) con 4,42, mientras c_1 (líquido) un valor de 3,30; en calor específico c_0 (sólido) presentó un valor alto de 0,96, a diferencia de c_1 (líquido), con un valor de 0,95 y en rendimiento se estableció que c_0 = (sólido) obtuvo un mayor valor con 443,75 y c_1 (líquido) un valor de 384,16.

4.2. Discusión

4.2.1. Discusión de Resultados

4.2.1.1. Con respecto al Factor A (Variedades de cacao)

De acuerdo con el pH se obtuvo en a_1 = (CCN51) con 4,15 y a_0 = (Nacional) logró un valor de 4,35, en comparación con el pH de 4,56 establecido en el proyecto Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación Reyes, J& otros (2016)., [37]. En la investigación Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales por Sánchez Riaño, A.& Gutiérrez Morales, A & Muñoz Hernández, J. A & Rivera Barrero., (2010) con el pH de (4 a 7) [33]. Por lo tanto, tiene semejanza debido al contenido de iones de hidrogeno presente en el mucílago del cacao.

En relación a los °Brix se presentó en a_1 = (CCN51) 15,05 y a_0 = (Nacional) obtuvo un valor de 10,6, mientras que en la investigación Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación Vallejo, Christian & Goya & Baquerizo Mariuxi., (2013), se encuentra entre (9 - 10,17) [38]. Al igual que en la investigación de Zapata, Ana María & Peláez, Carlos., (2010) en la Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas, se encuentra en (15max) [34]. Es decir que los tratamientos se encuentran en un rango superior de los parámetros. Esto se debe al contenido de azúcares presentes en el mucílago de cacao.

La cuantía preferente en la acidez fue en a_1 = (CCN51) con 0,80 y a_0 = (Nacional) alcanzó un dato de 0,90, estos valores son superior a (0,57 – 0,83) a los datos obtenidos, en la investigación Evaluación del Jugo de Diferentes Partes del Tallo de Caña de Azúcar por Modesto Bruno & Tasso Luis.,(2010), se encuentra entre (0-1,6) [39]. Si se encuentra en el rango, debido a que tiene similitud la materia prima de caña de azúcar y el mucílago de cacao.

En analogía a los grados alcohólicos se mostró una suma mínima de 50,00 que pertenece a $a_1=$ (CCN51), y $a_0=$ (Nacional) logró un valor alto de 51,58, En lo descrito de la Norma NTE INEN 368 1978-05. Bebidas alcohólicas [19]., determina que los °GL deben encontrarse entre (39 min. – 54 máx.), es decir que los procedimientos están dentro de las medidas, mientras que Vásquez, A., (2016) [19]., en la exploración sobre la Fermentación alcohólica una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas, se encuentra entre (10 a 12°GL) [40]. Estos valores son inferiores debido a que el mucílago de cacao presenta niveles altos de alcohol en sus características.

El dato superior en la densidad residió en $a_0=$ (Nacional) con 0,94 y $a_1=$ (CCN51) logró un valor de 0,93, estos datos son menores a (0,991 – 0,995) g/cm³ indicados por Santamaría., (2010), en la Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica [19]. Debido a que los grados alcohólicos del vino es menor, es decir entre más °GL menor densidad tendrá el producto [19]. Mientras que en la investigación Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas Zapata, Ana María & Peláez, Carlos., (2010) [41]. Se encuentra entre (1,05max), en comparación con los datos de esta investigación, se determina que el valor está más alto debido a que la materia prima (banano) es densa que el mucílago de cacao.

De acuerdo con la turbidez se consiguió una valía preferente de 4,66 que pertenece $a_1=$ (CCN51), y un valor mínimo en $a_0=$ (Nacional) con 3,07, estos datos están en el rango entre (3,07 – 4,66) establecido en la Eficiencia de la semilla Moringa Oleífera como coagulante natural para la remoción de la turbidez del río Sinú, mencionado por Feria Jhon., (2000) [42]. Lo que significa que el mucílago de cacao puede ser un coagulante natural para turbiedades iniciales.

En relación al calor específico se presentó una cantidad alta de 3,99 kJ/Kg°C que corresponde a_0 = (Nacional), mientras a_1 = (CCN51) obtuvo 3,98. Colombia en la era del alcohol carburante Elkin, Cortes Marín & González, Sánchez Hugo & Fernando, Álvarez Mejía., (2008), establece que el calor específico deben encontrarse en 2,38 kJ/KgK., [43]. Es decir que los tratamientos no están dentro de los parámetros, la reducción del calor específico es debido al contenido de oxígeno en la estructura del mucílago de cacao que componen el bioetanol y, por tanto, el porcentaje de carbono es menor que en el combustible diésel comercial.

El valor superior en rendimiento fue en a_1 = (CCN51) con 414,58 mL y a_0 = (Nacional) obtuvo un valor de 413,33 mL, estos valores no se encuentran en el rango (77,52– 572,64 mL) mencionados por Texo, J& Bentancur C & Duque J.,(2009), en su estudio sobre perspectivas generales de desarrollo de la industria de los biocombustibles en el Uruguay [44]., debido a que el rendimiento de un producto final obtenido de caña o de cacao, tienen similitudes en el peso de la muestra.

4.2.1.2. Con respecto al factor B (Porcentaje de levadura)

El pH que tiene una valía de 4,30 en b_1 = (0,01%), y b_0 = (0%) obtuvo un valor de 4,20, estos resultados son equivalentes a (4,5-5,5) pH citados por Mejía, Carlos., (2000) en su publicación sobre producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación- fermentación simultánea [45].

En relación a los °Brix se presentó una cantidad alta de 16,35, en b_2 = (0,05%), mientras b_0 = (0%) obtuvo un valor de 10,5; en la investigación caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de agave cupreata en la elaboración de mezcal, por Pérez, E & González, J& Chávez, M & Cortés, C., (2013) [46]. Se encuentra entre (12 - 15). Lo que determina que los niveles dados están dentro de los parámetros, esto se debe al contenido de azúcares presentes en el momento que las enzimas desdoblaron los almidones del mucílago de cacao.

El valor superior en la acidez fue en $b_1 = (\text{CCN51})$ con 15,01 y $b_2 = (0,05\%)$ obtuvo un valor de 9,43, estos valores están dentro del parámetro (9,9 – 12,6) mencionados por Fernández T & Marcet M & Olvira W & Martin C., (2010); en Aislamiento y evaluación de cepas termo tolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardientes y ron [47]., debido a que la acidez del bioetanol de mucílago de cacao, luego de pasar por un proceso fermentativo con porcentajes diferentes de levadura libera hidrogeno en su alcalinidad.

En relación a los grados alcohólicos se mostró un importe inferior de 47,37 que pertenece a $b_1 = (0,01\%)$, mientras $b_2 = (0,05\%)$ adquirió un valor alto de 52,62, que en la Norma NTE INEN 368 1978-05. Bebidas alcohólicas. Pisco, requisitos [48]., instituye que los °GL deben afiliarse a (39 min. – 54 máx.), lo que quiere decir que las muestras están igual de las medidas.

El dato alto en la densidad fue en $b_1 = (0,01\%)$ con 0,95 y $b_0 = (0\%)$ alcanzó un valor de 0,93, estos valores son menores a (1,11-1,07) g/cm³ sugerido por Blanco, A.,(2012) [19], en su estudio del efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel [19]., existe diferencia debido a la relación entre la masa y el volumen del bioetanol, por efecto del porcentaje de levadura en el proceso fermentativo.

Con respecto a la turbidez se alcanzó un valor superior de 6,35 que corresponde $b_1 = (0,01\%)$, y un valor mínimo en $b_0 = (0\%)$ con 1,86, estos datos están entre (2,50 – 8,50) establecido por Balón Enriqueen., (2014), en El aprovechamiento de efluentes agroindustriales ricos en aguas y almidonosas para la obtención de bioetanol mediante el uso de *Zymomonas mobilis* [49]., se encuentra acorde a los rangos dados debido al grado de transparencia que otorga un bioetanol de mucílago y de efluentes, ya que ambos son elaborados con desechos agroindustriales.

En relación al calor específico se presentó una cantidad alta de 0,96 que corresponde $b_0 = (0\%)$, mientras $b_1 = (0,01\%)$ obtuvo 0,94. Determinación de parámetros de cultivo de

Scheffersomyces stipitis y Saccharomyces cerevisiae para la fermentación de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol, Castillo, A [50]., instituye que los °GL comprometen encontrarse en (0,90 min. – 1 máx.), se expresa por lo tanto que los procedimientos están dentro de las medidas.

En rendimiento el resultado alto lo otorgó $b_2 = (0,05\%)$ con 426,87 y $b_1 = (0,01\%)$ adquirió un valor de 391,87, estos datos son superiores al rango (405,2– 551,4) mencionados en el estudio sobre la producción de bioetanol a partir de mezclas de jugos de melazas de caña de azúcar, Castillo, A [50]., debido a que el rendimiento de un producto final aplicado levadura es mucho más denso que un bioetanol a partir de melaza y jugo de caña de azúcar natural.

4.2.1.3. De acuerdo con el factor C (Tipo de materia prima)

El pH posee un resultado alto de 4,31 en $c_0 =$ (liquido), mientras $c_1 =$ (solido) alcanzó un valor de 4,15, estos datos son desemejantes a (5,52-5,90) pH, dichos por Ramírez, M., (2012), en su investigación de la Actividad antioxidante de clones de cacao (Theobroma cacao l.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas-México [51]. La variación podría ser por el contenido de alcalinidad de las muestras con mucílago de cacao, debido a que el cacao tiene el poder de fermentar rápido y naturalmente.

En relación a los °Brix se presentó una cantidad alta de 13,62, en $c_1 =$ (solido), mientras $c_0 =$ (liquido) obtuvo un valor de 12,02; en el proyecto de Bases técnicas para el aprovechamiento agroindustrial de especies nativas de la amazonia, se encuentra en un valor de (11), por Hernández, M [52]. Lo que determina que los niveles dados no están dentro de los parámetros, esto se debe al contenido de azúcares presentes el mucílago desde la recepción de la materia prima.

En relación a la Acidez se presentó una cantidad alta de 13,45, en $c_0 =$ (liquido), mientras $c_1 =$ (solido) obtuvo un valor de 8,17; en el proyecto sobre Efecto de la humedad del café crudo en las propiedades del café tostado, se encuentra entre (14,192) por Campo, E (2013)

[53]., lo que determina que los niveles se encuentran inferiores de los parámetros, esto se debe a que el mucílago de cacao fermenta rápido pero no presenta mucha acidez en comparación al café, que es más ácido según esta investigación.

En correlación a los grados alcohólicos se mostró un valor de 50,5 que concierne a c_0 = (liquido), mientras c_1 = (solido) obtuvo una cantidad alta de 51,08. Los valores cifrados como mínimos y máximos fueron tomados de la Norma Técnica Colombiana 708 (ntc 708. Bebidas Alcohólicas vinos de frutas) comprometen localizarse entre (9,25 min. – 20 máx.) por lo que los datos no están dentro de los parámetros, debido a que el mucílago de cacao desde ser materia prima natural se fermenta y ya presenta °GL, por ende, luego de la destilación se eleva el valor.

En densidad fue en c_1 = (solido) 0,94 y c_0 = (liquido) otorgó un valor de 0,93, estos datos son menores a (0,90-0,98) g/cm³ aludidos, en el estudio del efecto de la humedad del café crudo en las propiedades del café tostado, por Campo, Elías (2013) [53]., no existe diferencia, es decir que los valores planteados se encuentran en el rango de dicha investigación.

Con respecto a la turbidez se adquirió un valor superior de 4,42 que concierne c_1 = (solido), y un valor menor en c_0 = (liquido) de 3,30, estos resultados no están entre los rangos de (3,400 – 4,745) establecido por Zúñiga, Vanessa., en Caracterización ambiental de las vinazas de residuos de caña de azúcar resultantes de la producción de etanol [54]. Debido al grado de transparencia que otorga etanol de la caña de azúcar, tiene una mejor textura, apariencia más clara.

En relación al calor específico se presentó una cantidad alta de 0,96 que corresponde c_1 = (solido), mientras c_0 = (liquido) obtuvo 0,95. Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diésel mexicanos reformulados con Etanol, por Castillo, Patricia (2012) [55]., instituye que los resultados deben encontrarse entre (0,68-0,92.), esto determina que los tratamientos están dentro de los rangos.

En rendimiento tiene en c_1 = (sólido) 443,75 y c_0 = (líquido) logró un valor de 384,16, estos resultados están en el rango (339,4) mencionados por Castallo, Ader (2012)., en el estudio Producción de etanol a partir de harina de yuca utilizando diferentes estrategias en modo continuo [56]., debido a que el rendimiento de un etanol sea de mucílago o de yuca, posee características físicas similares, por ende, hay similitud.

4.3. Tratamiento de hipótesis

De acuerdo con los resultados obtenidos acerca de las variedades de Cacao (Nacional, CCN51), los porcentajes de levadura (0%, 0,01%, 0,05%) y el tipo de materia prima (Sólido y Líquido), éstos influyeron en la obtención final del bioetanol, por lo que se acepta las Hipótesis “Ha= El tipo de variedad de cacao, la aplicación de porcentajes de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* y el tipo de materia prima del cacao, influyen en el proceso fermentativo para la producción y rendimiento del bioetanol como producto final.”

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Los datos obtenidos de acuerdo al factor A, Los tipos de cacao (Nacional y CCN51), mostraron incidencia significativa en las características, en esta investigación, se determinó que el mucílago de cacao de CCN51, proporcionó, un pH de 4,07, 12,9 de

°Brix, 0,9 de acidez total, 60 °GL, turbidez de 2,93, una densidad de 0,91 g/cm³ , y un calor específico de 0,92 mientras que la variedad Nacional obtuvo un pH de 4,67, 13,6 de °Brix, 1,7 g/cm³ de acidez total, 52 grados de alcohol, turbidez 9,33, una densidad de 0,93 g/cm³, y un calor específico de 0,95 se concluye entonces que variedad de cacao CCN51 mostró mejores características fisicoquímicas como bioetanol.

- Los porcentajes de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (0%, 0,01% y 0,05%) adquirieron diferencia en los sólidos solubles con valores de 14,1 °Brix de 0%, 13,6 °Brix de 0,01% y 12,9 °Brix en 0,05%, se deduce que el porcentaje de levadura (*saccharomyces cerevisiae*) correcto para el proceso de fermentación de un bioetanol a partir de mucílago de cacao es 0,05%. Ya que permite que los azúcares se consuman con facilidad y generen más contenido de alcohol.
- Los datos obtenidos de acuerdo al factor C, Tipo de materia prima (Sólido y líquido) mostraron incidencia en las características fisicoquímicas, en este proyecto , se determinó que el mucílago de cacao de CCN51, proporcionó, un pH de 4,15, 12,02 de °Brix, 8,17 de acidez total, 51,08 °GL, turbidez de 3,30, una densidad de 0,93 g/cm³, y un calor específico de 0,95 mientras que la variedad Nacional obtuvo un pH de 4,31, 13,62 de °Brix, 13,45 g/cm³ de acidez total, 50,5 °GL, turbidez de 4,42, una densidad de 0,94 g/cm³, y un calor específico de 0,96, se concluye entonces; que la forma líquida de la materia prima del mucílago de cacao presentó mejores características fisicoquímicas como bioetanol.

5.2. Recomendaciones

- Utilizar el cacao CCN51 en el proceso de preparación del bioetanol, debido a que provee mejores características, como: acidez, pH, °Brix, grados alcohólicos,

turbidez, calor específico, densidad y rendimiento, también porque la oxidación es lenta al contraste de la variedad de cacao (Nacional), por lo que facilita el proceso de destilación. Además, estos resultados se localizan dentro de la Norma Técnica Mexicana NMX-V-034-1982. Alcohol Etílico (Etanol) [25].

- El porcentaje de levadura de *saccharomyces cerevisiae*, recomendado para utilizar en el proceso de fermentación del bioetanol a partir de mucílago de cacao, es 0,05% por que tiene mayor capacidad de desdoblar la concentración de almidón del mucílago y convertirlos en azúcares y este a su vez en alcohol y por consiguiente no afecta significativamente en el rendimiento.
- Para la elaboración de bioetanol, se recomienda utilizar el mucílago de cacao en forma líquida, mayor facilidad para su manejo; ya que proporciona mejores resultados, teniendo un pH óptimo de (4,06 - 4,67) los microorganismos se propagan en estas categorías, sabiendo que el pH de un bioetanol a partir de la mezcla glucosa /xilosa, puede fluctuar entre (3,4 – 5), cuanto más bajo sea este mayor será el problema para el desarrollo de las bacterias.

CAPÍTULO VI BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- [1] A. Márquez C, ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE DESPERDICIO DEL MUCÍLAGO DE CACAO Y SU APROVECHAMIENTO COMO ALTERNATIVA DE BIOCOMBUSTIBLE, 2015.
- [2] R. E. Trujillo, Estudio técnico para el montaje de una planta productora de herbicida natural que utilice como materia prima la baba de cacao, 2011.
- [3] A. E. ARANA ANALUISA y E. C. RUGEL JIMÉNEZ , PROPUESTA DE APROVECHAMIENTO DEL DESECHO MUCILAGO DE CACAO EN LA HACIENDA SANTA RITA, Guayaquil, 2017.
- [4] M. F. Girón Guerrero, Análisis de los niveles de desperdicio del mucílago de cacao y su aprovechamiento como alternativa de biocombustible, 2015.
- [5] E. Betancourt y F. Graziani, Efecto de los Tratamientos post-cosecha sobre la Temperatura y el Índice de Fermentación en la calidad del cacao criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo, 2005.
- [6] F. Plata, R. Velasco y L. Melgoza, UN CULTIVO DE LEVADURA (*Saccharomyces cerevisiae*) Y LA MONENSINA SÓDICA EN EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE OVINOS, 2004.
- [7] O. Cuellar, OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLAR ETANOL: AGUA (1:1) DE LA CÁSCARA DE CACAO Y LA EVALUACION DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, 2010.
- [8] F. Jiménez y M. Bonilla, APROVECHAMIENTO DE MUCÍLAGO Y MAGUEY DE CACAO (*Theobroma cacao*) FINO DE AROMA PARA LA ELABORACIÓN DE MERMELADA, 2012.
- [9] D. Abarca y R. Martínez, Residuos de Café, Cacao y Cladodio de Tuna: Fuentes Promisorias de Fibra Dietaria, 2010.
- [10] M. Engelbrecht, «Hipótesis sobre el origen y la función de la secreción de mucílago,» *Dialnet*, 2014.

- [11] F. D. Sánchez Mora y S. M. Medina Jara, «Potencial sanitario y productivo de 12 clones de cacao en Ecuador,» *Revista fitotecnica mexicana*, vol. 30, nº 3, 2015.
- [12] P. Mejia, Identificación taxonomica del cacao, 2000.
- [13] L. M. BAENA y N. A. GARCIA CARDONA., OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FIBRA DIETARIA A PARTIR DE CASCARILLA DE LAS SEMILLAS TOSTADAS DE *Theobroma cacao* L. DE UNA INDUSTRIA CHOCOLATERA COLOMBIANA., Pereira, 2012.
- [14] M. García, R. Quintero y A. López, Biotecnología alimentaria, México: LIMUSA S.A., 2004, pp. 263 - 311.
- [15] O. A. CUÉLLAR GARCÍA, OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLAR ETANOL: AGUA (1:1) DE LA CÁSCARA DE CACAO Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, Pereira, 2010.
- [16] C. A. Vallejo Torres, «UTILIZACIÓN DEL MUCÍLAGO DE CACAO, TIPO NACIONAL Y TRINITARIO, EN LA OBTENCIÓN DE JALEA,» *ESPAMCIENCIA*, vol. 7, nº 1, p. 52, 2016.
- [17] C. Suárez Machín, N. A. Garrido Carralero y C. . A. Guevara Rodríguez, «Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol,» *ICIDCA*, p. 21, 2016.
- [18] R. Rojo, M. Mendoza y C. García, Consumo y digestibilidad de pastos tropicales en toretes con suplementación nitrogenada y *Saccharomyces cerevisiae*, 2011.
- [19] J. Miranda, Evaluación de una bebida alcohólica destilada a partir de dos variedades de camote (*Ipomoea batatas*) utilizando dos tipos de enzimas, 2017.
- [20] H. Vázquez y O. Dacosta, «Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas,» *Ingeniería, investigación y tecnología* , vol. 8, nº 4, 2007.

- [21] L. Muller, Manual de laboratorio de Fisiología Vegetal, Turrialba: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A., 1964.
- [22] J. García, Maridaje, enología y cata de vinos, Primera ed., Malaga: Innovación y Cualificación, 2008.
- [23] H. Vázquez y O. Dacosta, «Fermentación alcohólica: Una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas,» *SciELO*, vol. 8, nº 4, 2007.
- [24] J. Roldán, C. Frauca y A. Dueñas, «Intoxicación por alcoholes,» *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, vol. 26, nº 1, 2003.
- [25] J. Téllez Mosquera y M. Cote Menéndez, «ALCOHOL ETÍLICO,» *Actualizacion*, vol. 54, nº 1, 2006.
- [26] J. . N. GRACIDA RODRÍGUEZ y B. PÉREZ DÍAZ, «Factores previos involucrados en la producción de bioetanol, aspectos a considerar,» *Revista internacional de contaminación ambiental*, vol. 30, nº 2, 2014.
- [27] M. Ferreyra, M. Schvab, L. Gerard, M. Zapata, C. Davies y A. Hours, «Fermentación alcohólica de jugo de naranja con *S. cerevisiae*,» *Ciencia, docencia y tecnología*, nº 39, 2009.
- [28] A. A. Navia Orcés y N. V. Pazmiño Piedra, “Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación”, Guayaquil, 2012.
- [29] F. Quimbita, P. Rodriguez y E. Vera, «Uso del exudado y placenta del cacao para la obtención de subproductos,» *Revista Tecnológica ESPOL*, vol. 26, nº 1, 2013.
- [30] A. Ramirez Velasquez, I. A. Montoya R y A. Montoya Restrepo , «Análisis del Potencial Competitivo del Bioetanol en Colombia,» *Gestion y Ambiente*, vol. 15, nº 2, 2012.

- [31] C. Castro Martínez, L. I. Beltrán Arredondo y J. C. Ortiz Ojeda, «PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y BIOETANOL:¿UNA ALTERNATIVA SUSTENTABLE A LA CRISIS ENERGÉTICA?,» *Ra Ximhai (Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable)*, vol. 8, nº 3, 2012.
- [32] J. C. Serrano Ruiz y R. Luque, «Biocombustibles líquidos: procesos y tecnologías,» *Real Sociedad Española de Química*, vol. 107, nº 4, p. 383–389, 2011.
- [33] A. Sánchez Riaño, A. Gutiérrez Morales, J. Muñoz Hernández y C. Rivera Barrero, «Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos,» *Tumbaga*, vol. 5, pp. 61-91, 2010.
- [34] A. M. Zapata y C. Peláez, «Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas,» *Tumbaga*, vol. 5, pp. 49-60, 2010.
- [35] L. D. Núñez Guzmán y D. A. Ayala Ortiz, «Impacto de la producción de bioetanol en el mercado del maíz,» *Redalyc*, vol. 14, nº 23, pp. 105-124, 2009.
- [36] C. e. g. R. NTE INEN 176, Normalización, Instituto Ecuatoriano de Normalización, Quito, 2016.
- [37] J. Reyes y otros, Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación, 2016.
- [38] C. Vallejo y M. Baquerizo, Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación, 2013.
- [39] B. Modesto y L. Tasso, Evaluación de la Acidez en el Jugo de Diferentes Partes del Tallo de Caña de Azúcar, 2010.
- [40] A. Vásquez, Fermentación alcohólica una opción para la producción de energía renovable a partir de desechos agrícolas, 2016.

- [41] A. Zapata y C. Peláez, Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas, 2010.
- [42] J. Feria, Eficiencia de la semilla Moringa Oleífera como coagulante natural para la remoción de la turbidez del río Sinú, 2000.
- [43] M. Cortes, H. González y F. Álvarez, Colombia en la era del alcohol carburante, 2008.
- [44] J. Texo, B. C y D. J., Perspectivas generales de desarrollo de la industria de los biocombustibles en el Uruguay, 2009.
- [45] C. Mejía, Producción de etanol a partir de almidón de yuca utilizando la estrategia de proceso sacarificación- fermentación simultánea, 2000.
- [46] E. Pérez, J. González, M. Chávez y C. Cortés, Caracterización fermentativa de levaduras productoras de etanol a partir de jugo de agave cupreata en la elaboración de mezcal, 2013.
- [47] T. Fernández, M. Marcet, W. Olvira y C. Martin, Aislamiento y evaluación de cepas termo tolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para la producción de aguardientes y rones, 2010.
- [48] T. C. Norma, Bebidas Alcohólicas vinos de frutas.
- [49] E. Balon, El aprovechamiento de efluentes agroindustriales ricos en aguas y almidonosas para la obtención de bioetanol mediante el uso de *Zymomonas mobilis*.
- [50] A. M. Castillo, Determinación de parámetros de cultivo de *Scheffersomyces stipitis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación de residuos lignocelulósicos para la obtención de bioetanol.
- [51] M. Ramirez, Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* l.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas-México.

- [52] M. . S. Hernández G y J. . A. Barrera G., BASES TÉCNICAS PARA EL APROVECHAMIENTO AGROINDUSTRIAL DE ESPECIES NATIVAS DE LA AMAZONIA.
- [53] E. R. Campo, «Efecto de la humedad del café crudo en las propiedades del café tostado,» vol. 9, nº 2, 2013.
- [54] V. Zuñiga, Caracterización ambiental de las vinazas de residuos de caña de azúcar resultantes de la producción de etanol.
- [55] P. Castillo, Análisis de las propiedades fisicoquímicas de gasolina y diésel mexicanos reformulados con Etanol, 2012.
- [56] A. Castallo, estudio Producción de etanol a partir de harina de yuca utilizando diferentes estrategias en modo continuo.
- [57] E. Ube, Implementación y posicionamiento del yogurt a base de soya como producto alternativo al yogurt lacteo en la ciudad de Guayaquil (Doctoral dissertation),, Guayaquil , 2011.
- [58] A. Reza, «Experimental research design and analysis: a practical approach for agricultural and natural sciences.,» 1994.
- [59] R. Zavalía, M. Alcocer y F. Fuentes, Desarrollo del cultivo de chíá en Tucumán, República Argentina. 32(4), 27-30., vol. 32, Argentina, 2011, pp. 27- 30 .
- [60] L. Suarez, Mucilago de cacao, 2010.
- [61] D. García, Elaboracion de una bebida alcoholica a partir de la fermentacion del mucilago de cacao, 2008.
- [62] L. Villacrés, Proceso fermentativo del mucilago de cacao, 1985.

- [63] G. Vilbo, Levaduras para fermentacion alcoholica, 2011.
- [64] Muniesa, Obtencion de una bebida alcoholica, aplicando levaduras activas, 2009.
- [65] M. Goya, Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculacion, 2013.
- [66] J. Hernandez, Obtención a escala laboratorio de polifenoles a partir de la cascara de cacao y su utilidad como aditivo conservante de aceites vegetales comestibles, 2015.
- [67] A. Vasquez, «Cacao alkaloids and polyphenols: Mechanisms that regulate their biosynthesis and its implications on the taste,» 2016.
- [68] P. Perez, Mucilago pulverizado obtenido a partir de la cascara de cacao, una alternativa de la clarificacion de jugos en la industria panelera, 2004.
- [69] E. Vera, Uso del exudado y placenta del cacao para la obtención de subproductos, 2013.
- [70] A. Blanco, M. Quicazán y M. Cuenca, «Efectos de algunas fuentes de nitrogeno en la fermentación alcohólica de la miel,» *Vitae*, vol. 19, nº 1, pp. 33- 36, 2012.
- [71] J. Mesas y M. Alegre, «El papel de los microorganismos en la elaboración del vino,» *Ciencia y Tecnología*, vol. 2, nº 4, pp. 174 - 183, 1999.
- [72] INEN 341, «Bebidas alcoholicas determinacion de la acidez.,» Quito-Ecuador, 1978.
- [73] C. Castro Martinez , L. . I. Beltrán Arredondo y J. . C. Ortiz Ojeda , «PRODUCCIÓN DE BIODIESEL Y BIOETANOL:¿UNA ALTERNATIVA SUSTENTABLE A LA CRISIS ENERGÉTICA?,» *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo*, vol. 8, nº 3, 2012.
- [74] J. Macarulla y F. Goñi, Bioquímica, Segunda ed., Barcelona: Reverté S.A. , 1994.

- [75] P. Santamaría, R. López, A. Gutiérrez y E. García, «Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica,» *Dialnet*, nº 7, pp. 137 - 149, 1995.
- [76] R. López, A. Gutiérrez y E. García, «Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica,» *Dialnet*, vol. 137, nº 7, 1995.
- [77] . M. J. GOYA BAQUERIZO, “Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación”, 2013.
- [78] P. Perez Echeverry, Mucilago pulverizado obtenido a partir de la cascara de cacao, una alternativa en la clarificación de jugos en la industria panelera, Manizales, 2004.
- [79] P. J. Hernandez, Obtención a escala laboratorio de polifenoles a partir de la cáscara de cacao y su utilidad como aditivo conservante de aceites vegetales comestibles, Guayaquil, 2015.
- [80] A. A. Navia Orcés y N. V. Pazmiño Piedra, Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación, Guayaquil, 2012.
- [81] J. N. Reyes Valadez, P. Quintana Hernández, C. Coronado Velasco y A. Castro Montoya, «Simulación del proceso de producción de bioetanol a partir de la mezcla glucosa/xilosa incluyendo los efectos de temperatura, pH y concentración de azúcares,» *Scielo (Revista mexicana de ingeniería química)*, vol. 5, nº 1, 2016.
- [82] M. Goya, Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación, 2013.
- [83] Santamaría, Influencia de la temperatura en la fermentación alcohólica, 2010.
- [84] P. Blanco, estudio del efecto de algunas fuentes de nitrógeno en la fermentación alcohólica de miel.

- [85] j. Martínez, producción de bioetanol a partir de mezclas de jugos de melazas de caña de azúcar.
- [86] C. Vallejo, Obtención de una bebida alcohólica a partir de mucílago de cacao, mediante fermentación anaerobia en diferentes tiempos de inoculación.
- [87] A. Ramírez, Actividad antioxidante de clones de cacao (*Theobroma cacao* L.) finos y aromáticos cultivados en el estado de Chiapas-México, 2012.
- [88] A. Navia y N. Pazmiño, Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación, 2012.
- [89] C. Navarre y Lavoisier, *L'oenologie*, cuarta ed., París: Lavoisier Tec. & Doc, 1994.
- [90] J. González y M. Manuel, ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA Y EL PROCESO FERMENTATIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE ALCOHOL, 2006.
- [91] L. Diaz y M. Pinargote, Análisis de las Características Organolépticas del Chocolate a partir de Cacao CCN51 Tratado Enzimáticamente y Tostado a Diferentes Temperaturas, 2011.
- [92] R. Alejandro. y I. Montoya, Analysis of the Competitive Potential of Bioethanol in Colombia, 2012.
- [93] P. Quimbita y F. Rodriguez, Aprovechamiento del exudado y la placenta del cacao (*Theobroma cacao*) para la producción de una bebida de baja concentración y elaboración de nectar, 2008.
- [94] D. L. R. Gómez, L. Soto y Rutiaga, Elaboración de una bebida alcohólica con *Saccharomyces cerevisiae*, 2009.
- [95] J. Lledías, M. Folch, A. Garay y F. Arroyo, La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, 2004.

- [96] E. Portillo y I. Villasmil, Características sensoriales del cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) de Venezuela en función del tratamiento poscosecha, 2014.
- [97] A. Sánchez, A. Gutiérrez y J. Muñoz, Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos, 2010.
- [98] A. Zapata y C. Peláez, Producción en continuo de etanol a partir de banano de rechazo (cáscara y pulpa) empleando células inmovilizadas, 2010.

CAPÍTULO VII
ANEXO

Anexo 1. Valores de los análisis realizados al bioetanol destilado a partir del mucílago de cacao

N# Tratamientos	Factor A	Factor B	Factor C	Repetición	pH	Brix	Acidez	Densidad (g)	°GL	Turbidez (NTU)	Calor Especifico	Rendimiento (ml)
1	Nacional	0	Solido	1	4,24	13,6	1	0,92792	56	1,178	0,9552	450
2	Nacional	0,01	Solido	1	4,34	13,4	1	0,9555	46	5,786	0,9612	455
3	Nacional	0,05	Solido	1	4,65	12,5	1,4	0,9689	55	0,018	0,9576	500
4	Nacional	0	Liquido	1	4,06	14,1	1,6	0,9360	50	1,860	0,9532	470
5	Nacional	0,01	Liquido	1	4,07	12,1	1,6	0,9480	50	4,999	0,9534	340
6	Nacional	0,05	Liquido	1	4,67	12,9	1,7	0,9174	52	6,761	0,9591	470
7	CCN51	0	Solido	1	4,05	12,6	1,3	0,9157	53	2,091	0,9565	480
8	CCN51	0,01	Solido	1	4,20	13,1	1,3	0,9247	51	14,03	0,9522	415
9	CCN51	0,05	Solido	1	4,07	15,3	1,2	0,9313	52	2,930	0,9598	550
10	CCN51	0	Liquido	1	4,14	12,9	1,4	0,9177	52	1,718	0,9211	400
11	CCN51	0,01	Liquido	1	4,18	10,6	1,1	0,9478	40	3,734	0,9733	310
12	CCN51	0,05	Liquido	1	4,70	13,6	0,9	0,9358	52	9,337	0,9231	230
13	Nacional	0	Solido	2	4,07	13,5	1,0	0,9625	50	2,643	0,9611	245
14	Nacional	0,01	Solido	2	4,45	14,8	1,1	0,9609	45	4,727	0,9689	380
15	Nacional	0,05	Solido	2	4,36	14,1	1,3	0,9774	60	2,253	0,9412	485
16	Nacional	0	Liquido	2	4,25	13,2	0,9	0,9599	55	2,106	0,9501	465
17	Nacional	0,01	Liquido	2	4,06	11,7	0,8	0,9237	45	2,354	0,9421	375
18	Nacional	0,05	Liquido	2	4,35	15,0	0,9	0,9229	55	2,204	0,9612	325
19	CCN51	0	Solido	2	4,03	13,3	1	0,9323	50	2,123	0,9509	465
20	CCN51	0,01	Solido	2	4,14	12,9	1	0,9866	50	13,40	0,9554	380
21	CCN51	0,05	Solido	2	4,01	11,5	0,9	0,9229	45	1,918	0,9555	520
22	CCN51	0	Liquido	2	4,36	14,6	1,2	0,9627	53	1,187	0,9598	410
23	CCN51	0,01	Liquido	2	4,18	14,0	1,1	0,9252	52	1,842	0,9521	480
24	CCN51	0,05	Liquido	2	4,06	13,8	1,2	0,9626	50	1,616	0,9507	335

Elaborado por: Angulo, G. (2017)

Anexo 2. Análisis de Varianza para pH (%) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replicas	0,0459375	1	0,0459375	1,59	0,2340
EFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	0,0876042	1	0,0876042	3,02	0,1099
Factor B	0,0351583	2	0,0175792	0,61	0,5624
Factor C	0,127604	1	0,127604	4,40	0,0597
INTERACCIONES					
AB	0,0387583	2	0,0193792	0,67	0,5320
AC	0,00700417	1	0,00700417	0,24	0,6326
BC	0,158658	2	0,0793292	2,74	0,1084
ABC	0,185858	2	0,0929292	3,21	0,0799
RESIDUOS	0,318713	11	0,0289739		
TOTAL (CORREGIDO)	1,0053	23			

Nivel de confianza $p < 0.05$

Coefficiente de variación: 4,02

Elaborado por: Angulo, G. (2017).

Anexo 3. Análisis de Varianza para Densidad (g) - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replicas	0,00124531	1	0,00124531	3,69	0,0811
EFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	0,000381763	1	0,000381763	1,13	0,3105
Factor B	0,000209521	2	0,00010476	0,31	0,7395
Factor C	0,000476329	1	0,000476329	1,41	0,2600
INTERACCIONES					
AB	0,000183883	2	0,0000919413	0,27	0,7667
AC	0,00140332	1	0,00140332	4,16	0,0663
BC	0,00104156	2	0,000520782	1,54	0,2568
ABC	0,00151239	2	0,000756197	2,24	0,1528
RESIDUOS	0,00371512	11	0,000337738		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0101692	23			

Nivel de confianza $p < 0.05$

Coefficiente de variación: 1,95

Elaborado por: Angulo, G. (2017).

Anexo 4. Análisis de Varianza para Calor específico ($\frac{cal}{g^{\circ}C}$) - Suma de Cuadrados Tipo III

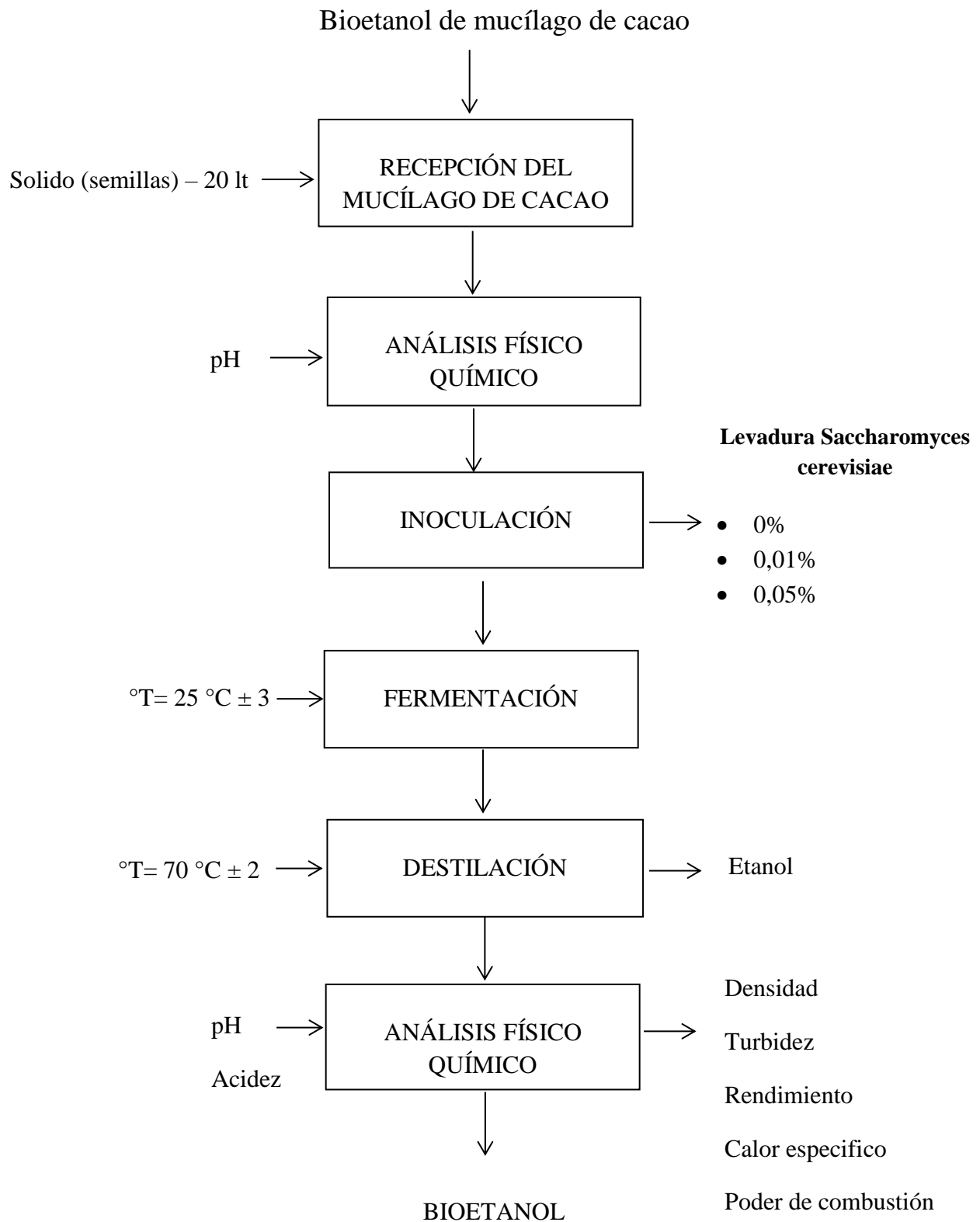
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
COVARIABLES					
Replicas	0,0000226204	1	0,0000226204	0,15	0,7021
EFECTOS PRINCIPALES					
Factor A	0,00012105	1	0,00012105	0,82	0,3832
Factor B	0,000267228	2	0,000133614	0,91	0,4306
Factor C	0,0000759704	1	0,0000759704	0,52	0,4868
INTERACCIONES					
AB	0,0000409908	2	0,0000204954	0,14	0,8712
AC	0,0006923	1	0,0006923	4,72	0,0526
BC	0,000150061	2	0,0000750304	0,51	0,6133
ABC	0,000249591	2	0,000124795	0,85	0,4535
RESIDUOS	0,00161425	11	0,00014675		
TOTAL (CORREGIDO)	0,00323407	23			

Nivel de confianza $p < 0.05$

Coefficiente de variación:

Elaborado por: Angulo, G. (2017)

Anexo 5. Modelo del proceso fermentativo del mucílago de cacao para la producción de bioetanol



Elaborado por: Angulo, G. (2017)

Anexo 6. Fotografías del proceso fermentativo del mucílago de cacao, para la producción de bioetanol



Materia prima
(Casa de cacao)



Recepción de materia prima:
sólido (semilla), líquido (baba
de cacao)



Envasado de la materia prima,
en 24 botellas



Incorporación de levadura a
cada muestra



Comienzo del proceso
fermentativo (líquido)



Transcurso del proceso
fermentativo (sólido)



Proceso fermentativo
culminado, listo para destilar



Destilador, ubicado en el
laboratorio de Operaciones
Unitarias



Colocando al destilador, cada
muestra.



Destilador, expulsando el
etanol como producto final



Etanol , extraído por cada
muestra, al acontecer los días



Etanol , extraído de las 24
muestras fermentadas

Anexo 7. Fotografías de los análisis físico-químicos



Análisis de pH (tomado a la materia prima)



Análisis de °Brix (medido a la materia prima)



Análisis de pH



Análisis de °Brix



Análisis de Acidez



Análisis de Grados alcohólicos



Análisis de Densidad



Análisis de Rendimiento



Análisis de Turbidez



Análisis de Calor específico



Análisis de Poder de combustión
(Mezcla de las 24 muestras)

Anexo 8. Certificado de Laboratorio de Bromatología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA
Dirección km 1 ½ vía Sto. Domingo Teléfono: 052750320
FAX: (593-06) 752300 753-503 CASILLA Quevedo: 73
www.uteg.edu.ec
Quevedo-Los Ríos-Ecuador

CERTIFICACION

Quevedo, 12 de Septiembre del 2017

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente certifico que la Srta. ANGULO ORTEGA GABRIELA DEL CARMEN con CI: 120668525-5, realizó los análisis de pH, Grados Brix, Acidez Titulable, Grados Alcohólicos, Densidad en muestras de etanol a partir de cacao, correspondiente a la tesis titulada "EVALUACION DEL PROCESO FERMENTATIVO DEL MUCILAGO DE CACAO, APLICANDO SACCHAROMYCES CEREVISIAE, PARA LA PRODUCCION DE BIOETANOL", en este laboratorio, con la guía de la Ing. Lourdes Ramos, Coordinadora del Laboratorio.

Autorizo a la Srta. ANGULO ORTEGA GABRIELA DEL CARMEN dar el presente certificado el uso que estime conveniente.

Atentamente,

Ing. Lourdes Ramos Mackliff

ENCARGADA DEL LABORATORIO DE BROMATOLOGIA

Anexo 9. Certificado del Laboratorio de Suelo y Agua de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA
Dirección km 1 1/2 vía Sto. Domingo Teléfono: 052750320
FAX: (593-06) 752300 753-503 CASILLA Quevedo: 73
www.uteq.edu.ec
Quevedo-Los Ríos-Ecuador

CERTIFICACION

Quevedo, 05 de octubre del 2017

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente certifico que la Srta. ANGULO ORTEGA GABRIELA DEL CARMEN con CI: 120668525-5, realizó los análisis de Turbidez y Rendimiento en muestras de etanol a partir de cacao, correspondiente a la tesis titulada "EVALUACION DEL PROCESO FERMENTATIVO DEL MUCILAGO DE CACAO, APLICANDO SACCHAROMYCES CEREVISIAE, PARA LA PRODUCCION DE BIOETANOL", en este laboratorio, con la guía del Ing. José Vargas Sánchez, Coordinador del Laboratorio.

Autorizo a la Srta. ANGULO ORTEGA GABRIELA DEL CARMEN dar el presente certificado el uso que estime conveniente.

Atentamente,



Ing. José Vargas Sánchez

ENCARGADO DEL LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA- UTEQ

Anexo 10. Certificado del Laboratorio de Termología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA
Dirección km 1 ½ vía Sto. Domingo Teléfono: 052750320
FAX: (593-06) 752300 753-503 CASILLA Quevedo: 73
www.uteq.edu.ec
Quevedo-Los Ríos-Ecuador

CERTIFICACION

Quevedo, 16 de octubre del 2017

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente certifico que la Srta. ANGULO ORTEGA GABRIELA DEL CARMEN con CI: 120668525-5, realizó el análisis de Calorimetría, en muestras de etanol a partir de cacao, correspondiente a la tesis titulada "EVALUACION DEL PROCESO FERMENTATIVO DEL MUCILAGO DE CACAO, APLICANDO SACCHAROMYCES CEREVISIAE, PARA LA PRODUCCION DE BIOETANOL", en este laboratorio, con la guía de la Ing. Cristhian Vallejo, Coordinador del Laboratorio.

Autorizo a la Srta. ANGULO ORTEGA GABRIELA DEL CARMEN, dar el presente certificado el uso que estime conveniente.

Atentamente,

Ing. Cristhian Vallejo
ENCARGADO DEL LABORATORIO DE TERMOLOGÍA

Anexo 11. Certificado del Laboratorio de Operaciones Unitarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo

**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA
Dirección km 1 1/2 vía Sta. Domingo Teléfono: 052750320
FAX: (593-08) 752300 753-503 CASILLA Quevedo- 73
www.uteq.edu.ec
Quevedo-Los Rios-Ecuador

CERTIFICACION

Quevedo, 23 de octubre del 2017

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente certifico que la Srta. ANGULO ORTEGA GABRIELA DEL CARMEN con CI: 120668525-5, utilizó el equipo Destilador, para convertir el proceso fermentativo del mucilago de cacao en etanol de 24 muestras, a su vez también manipuló un motor del área de mecánica para comprobar el poder de combustión del bioetanol mezclado con gasolina; correspondiente a la tesis titulada "EVALUACION DEL PROCESO FERMENTATIVO DEL MUCILAGO DE CACAO, APLICANDO SACCHAROMYCES CEREVISIAE, PARA LA PRODUCCION DE BIOETANOL", en este laboratorio, con la guía de la Ing. Amado Coello Montoya, Coordinador del Laboratorio.

Autorizo a la Srta. ANGULO ORTEGA GABRIELA DEL CARMEN, dar el presente certificado el uso que estime conveniente.

Atentamente,



Ing. Amado Coello Montoya
ENCARGADO DEL LABORATORIO DE OPERACIONES UNITARIAS- UTEQ

Anexo 12. Norma Técnica Mexicana NMX-V-034-1982. ALCOHOL ETÍLICO (ETANOL)

ESPECIFICACIONES	GRADOS													
	1	2	3	4	5	6	7		8		9		10	
							MÍN	MÁX	MÍN	MÁX	MÍN	MÁX	MÍN	MÁX
Grado alcohólico real a 288 K (15°C) % de alcohol en volumen a 288 K (15°C)	99.0	99.0	96.0	96.0	94.0	94.0	55.1	95.9	55.1	95.9	55.1	93.9	55.1	93.9
Acidez total (como ácido acético), aldehídos (como acetato de etilo) alcoholes superiores (aceite de fusel) como alcohol amílico) y furfural. Valor máximo expresado en mg/ dm ³ referidos a alcohol 100 %.	125	1000	75	125	1000	300		75		125		1000		300

Anexo 13. Norma Técnica Ecuatoriana INEN 368. Pisco requisitos

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	BEBIDAS ALCOHOLICAS PISCO REQUISITOS		INEN 368 1978-05	
Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno EB-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción	1. OBJETO			
	1.1 Esta norma tiene por objeto establecer los requisitos que debe cumplir el pisco para ser considerado apto para el consumo humano.			
	2. TERMINOLOGIA			
	2.1 Pisco. Es el aguardiente obtenido de la destilación del mosto fermentado de uvas maduras, en presencia del orujo correspondiente.			
	3. DISPOSICIONES GENERALES			
	3.1 La materia prima usada en la elaboración del pisco debe encontrarse limpia y en perfecto estado de conservación.			
	3.2 La fermentación del mosto debe hacerse con fermentos seleccionados.			
	3.3 La destilación debe efectuarse en un equipo adecuado, a fin de obtener un producto que cumpla con los requisitos establecidos en la Tabla 1.			
	4. REQUISITOS DEL PRODUCTO			
	4.1 El pisco debe presentar aspecto límpido, transparente y ser incoloro o ligeramente amarillento.			
4.2 Debe tener el sabor y el olor característico de esta bebida.				
4.3 El pisco debe cumplir con los requisitos establecidos en la Tabla 1.				
TABLA 1. Requisitos del pisco				
REQUISITOS	UNIDAD	Min.	Máx.	METODO DE EN SAYO
Grado alcohólico a 15° C.	°GL	39	54	INEN 340
Acidez volátil, como ácido acético.	(a)	-	0,2	INEN 341
Esteres, como acetato de etilo.	(a)	-	0,2	INEN 342
Aldehídos, como etanal,	(a)	-	0,02	INEN 343
Furfural.	(a)	-	0,004	INEN 344
Alcoholes superiores.	(a)	-	0,3	INEN 345
Extracto seco.	(a)	-	0,05	INEN 346
Metanol.	(b)	-	0,25	INEN 347
Acido clanhídrico	g/l	-	0,05	INEN 361
(a) g/100 cm ³ de alcohol anhidro.				
(b) cm ³ / 1 000 cm ³ de alcohol anhidro.				

4.4 El pisco no debe contener sustancias empleadas comúnmente como desnaturalizantes de alcoholes ni ácidos minerales u orgánicos extraños a la composición normal del producto.

4.5 No debe contener esencias, extractos, mezclas aromáticas, materias colorantes, edulcorantes artificiales ni sustancias conservadoras de uso prohibido.

5. REQUISITOS COMPLEMENTARIOS

5.1 Envasado

5.1.1 El pisco debe envasarse en recipientes cuyo material ser resistente a la acción del producto y no altere las características del mismo

5.1.2 Los envases deben estar perfectamente limpios antes del llenado.

5.1.3 Los envases deben disponer de un adecuado cierre o tapa, de tal forma que se garantice la inviolabilidad del recipiente y las características del producto

5.1.4 El espacio libre no debe exceder del 5% del volumen del envase comercial (ver INEN 359).

5.2 Rotulado

5.2.1 En todos los envases deben constar, con caracteres legibles e indelebles, las indicaciones siguientes:

- a) razón social de la empresa,
- b) denominación del producto: "Pisco",
- c) volumen, en centímetros cúbicos,
- d) grado alcohólico del producto,
- e) número del Registro Sanitario y del Registro de Expendio,
- f) número del lote y fecha de fabricación, y
- g) leyenda "Industria Ecuatoriana", si es procedente.

5.2.2 Si el producto es importado, debe indicarse, además, el país de origen y el lugar de envasado.

5.2.3 No debe tener leyendas de significado ambiguo ni descripción de las características del producto que no puedan ser debidamente comprobadas

6. MUESTREO

6.1 El muestreo debe realizarse de acuerdo con la Norma INEN 339.