

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE INFUSIÓN
FERMENTADA DE CASCARILLA DE CACAO.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTAN:

**ALONDRA VELAZQUEZ MÉNDEZ
GABY MARIEL VIVAS GARCÍA**

DIRECTOR:

DR. JOSÉ ARNOLD GONZÁLEZ GARRIDO

CUNDUACAN, TABASCO

NOVIEMBRE 2024

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Declaración de Autoría y Originalidad

En la Ciudad de Cunduacán, el día 8 de Noviembre del año 2024, las que suscriben Alondra Velázquez Méndez y Gaby Mariel Vivas García alumnas del Programa de Químico Farmacéutico Biólogo con número de matrícula 162A20057y 162A20111, adscrito a la Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo, de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, como autor(a) (es) de la Tesis presentada para la obtención del Título de licenciado en Químico Farmacéutico Biólogo y titulada “CARACTERIZACION FISICO QUIMICA Y MICROBIOLOGICA DE LA INFUSION FERMENTADA DE LA CASCARILLA DE CACAO” dirigida por el Dr. José Arnold González Garrido.

DECLARO QUE:

La Tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la LEY FEDERAL DEL DERECHO DE AUTOR (Decreto por el que se reforman y adicionan diversas disposiciones de la Ley Federal del Derecho de Autor del 01 de Julio de 2020 regularizando y aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita. Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad o contenido de la Tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente

Cunduacán, Tabasco a 8 de noviembre 2024.



Alondra Velázquez Méndez

Nombre y Firma



Gaby Mariel Vivas García

Nombre y Firma

DIRECCIÓN

Cunduacán, Tabasco; a 07 de junio de 2024.

C. GABY MARIEL VIVAS GARCÍA
PASANTE DE LA LIC. EN QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T E

Por medio del presente, me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **"CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE INFUSIÓN FERMENTADA DE CASCARILLA DE CACAO"**, dirigido por el Dr. José Arnold González Garrido, bajo la modalidad de titulación por **Tesis**. La comisión de revisión conformada por el Dr. Rafael Omar Saavedra Díaz, Dr. Carlos Javier López Victorio, Dr. Roberto Hernández Córdova, Mtro. Abraham González González y Mtra. Mónica León Navarro, liberó el documento en virtud de que reúne los requisitos para el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente.

Sin otro particular, reciba usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL
DIRECTORA

C.c.p. Pasante.
C.c.p. Archivo.

DIRECCIÓN

Cunduacán, Tabasco; a 07 de junio de 2024.

C. ALONDRA VELÁZQUEZ MÉNDEZ
PASANTE DE LA LIC. EN QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T E

Por medio del presente, me dirijo a usted para hacer de su conocimiento que proceda a la impresión del trabajo titulado **"CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE INFUSIÓN FERMENTADA DE CASCARILLA DE CACAO"**, dirigido por el Dr. José Arnold González Garrido, bajo la modalidad de titulación por **Tesis**. La comisión de revisión conformada por el Dr. Rafael Omar Saavedra Díaz, Dr. Carlos Javier López Victorio, Dr. Roberto Hernández Córdova, Mtro. Abraham González González y Mtra. Mónica León Navarro, liberó el documento en virtud de que reúne los requisitos para el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente.

Sin otro particular, reciba usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

DRA. HERMICENDA PÉREZ VIDAL
DIRECTORA

C.c.p. Pasante.
C.c.p. Archivo.

Carta de Cesión de Derechos

Villahermosa, Tabasco a 8 de noviembre del 2024.

Por medio de la presente manifestamos haber colaborado como AUTOR(A) y/o AUTORES(RAS) en la producción, creación y/o realización de la obra denominada **CARACTERIZACIÓN FISICOQUIMICA Y MICROBIOLOGICA DE INFUSION FERMENTADA DE CASCARILLA DE CACAO.**

Con fundamento en el artículo 83 de la Ley Federal del Derecho de Autor y toda vez que, la creación y/o realización de la obra antes mencionada se realizó bajo la comisión de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; entendemos y aceptamos el alcance del artículo en mención, de que tenemos el derecho al reconocimiento como autores de la obra, y la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco mantendrá en un 100% la titularidad de los derechos patrimoniales por un período de 20 años sobre la obra en la que colaboramos, por lo anterior, cedemos el derecho patrimonial exclusivo en favor de la Universidad.

COLABORADORES



Alondra Velázquez Méndez

Egresada



GABY VIVAS GARCIA

Gaby Mariel Vivas García

Egresada



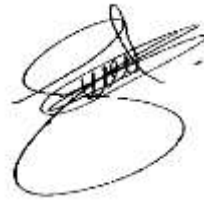
José Arnold González
Garrido

Director

TESTIGOS



Laura Skari López Gallegos



Diana Josefa Flores Estefano

LICENCIATURA - CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE INFUSIÓN FERMENTADA DE CASCARILLA DE CACAO

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	ri-ng.uaq.mx Internet	294 palabras – 3%
2	repositorio.puce.edu.ec Internet	149 palabras – 2%
3	ciatej.repositorioinstitucional.mx Internet	128 palabras – 1%
4	hdl.handle.net Internet	124 palabras – 1%
5	repositorio.espam.edu.ec Internet	75 palabras – 1%
6	pt.scribd.com Internet	65 palabras – 1%
7	ww.ucol.mx Internet	53 palabras – 1%
8	epdf.pub Internet	52 palabras – 1%
9	doczz.es Internet	46 palabras – 1%



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS BÁSICAS

ESTUDIOS
TERMINALES

DEDICATORIA:

A mis padres, quienes nunca me han dejado sola, siempre me han brindado amor y su apoyo incondicional, en especial mi madre que a pesar de las altas y bajas que tuve, no perdió la confianza en mí. A mi padre, quien no dejó de trabajar arduamente para que no me faltara lo necesario.

A mis hermanos que han sido parte importante en todas las etapas de mi vida, incluida esta, espero que sigan presentes en las siguientes etapas que aún me quedan por vivir. A mis amigos y personas que estuvieron de cerca poniendo un granito de arena desde la motivación, la compañía, e incluso el apoyo en actividades académicas, confiando en mí aun cuando ni yo lo hacía, quienes también me animaban a seguir luchando por un sueño que creía inalcanzable.

AVM.

A mis padres por su amor y sacrificio; a mi madre, quien siempre ha estado conmigo en cada proceso y proyecto de mi vida, la que me ha motivado a través de sus consejos, su amor y su paciencia.

A mi padre †, que aun cuando no se encuentra conmigo en vida, fue el pilar más importante durante este proceso, el que me impulsó a culminar esta gran meta y que además me dejó grandes enseñanzas para poder enfrentar mi día a día. Estoy segura de que nunca me dejó sola, pues sigue presente a través de mis recuerdos, y sé que desde donde quiera que se encuentre está orgulloso y celebra mis logros junto con mi madre y conmigo.

A mis hermanos por siempre estar conmigo y darme ánimos de seguir adelante, por apoyarme en cada decisión tomada y jamás dejarme sola.

A mi esposo, quien ha sido mi compañero de travesías durante toda la carrera, y me ha animado a continuar mis sueños. Y finalmente a mi hijo, quien es mi motor, mi impulso para seguir luchando por todo lo que he logrado y quiero seguir logrando.

GMVG.

AGRADECIMIENTOS:

Agradecemos primeramente a Dios por nuestra vida, por la familia que nos brindó a cada una de nosotras y la capacidad y posibilidad para concluir nuestros estudios.

A los profesores que estuvieron presentes durante toda la carrera, los cuales nos brindaron tiempo y transmitieron sus conocimientos a través de las clases, de sus consejos e incluso desde sus anécdotas. Agradecemos también a quienes nos brindaron tiempo, espacio e insumos durante este proceso de hacer tesis.

Gracias al comité revisor, por sus correcciones y observaciones, ya que fueron punto clave para saber dónde enfocarnos y mejorar.

Y sobre todo agradecemos al Dr. José Arnold González Garrido, quien nos brindó su apoyo desde el día número 1°, nos dio su voto de confianza para llevar a cabo este proyecto y no nos dejó solas durante todo el proceso al realizar nuestro trabajo.

1. ÍNDICE

1.	ÍNDICE.....	1
1	ÍNDICE DE FIGURAS.....	3
2	ÍNDICE DE TABLAS.....	4
3	ABREVIATURAS.....	5
4	RESUMEN.....	7
5	INTRODUCCIÓN.....	9
6	MARCO TEORICO.....	10
6.1	Flavonoides.....	10
6.2	Efectos asociados a la cascarrilla de cacao.....	12
6.3	Beneficios de la fermentación en los alimentos.....	13
6.4	Fermentación de infusiones herbales.....	14
7	JUSTIFICACIÓN.....	15
8	HIPÓTESIS.....	16
9	OBJETIVO GENERAL.....	16
10	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
11	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
11.1	Material vegetal.....	17
11.2	Consortio microbiano.....	17
11.3	Material químico.....	17
12	MÉTODOS.....	17
12.1	Efecto de la temperatura en la extracción de compuestos polifenólicos totales de la infusión.....	17
12.2	Elaboración de bebidas fermentadas.....	18
12.3	Determinación de biomasa.....	18
12.4	Determinación de pH.....	18
12.5	Determinación de cenizas totales.....	18
12.6	Determinación de azúcares reductores.....	19
12.7	Determinación de proteínas.....	19
12.8	Cuantificación de polifenoles hidrolizables por el método de Folin-Ciocalteu.....	19
12.9	Determinación de actividad antioxidante.....	19

12.10	Conteo de bacterias ácido-lácticas.....	20
12.11	Conteo de bacterias acido-acéticas.....	21
12.12	Conteo de levaduras.....	21
12.13	Análisis estadístico.....	21
13	RESULTADOS.....	21
13.1	Temperatura de extracción de compuestos polifenólicos de la infusión de cascarilla de cacao.....	21
13.2	Determinación de Minerales.....	25
13.3	Determinación de azúcares reductores.....	29
14	DISCUSIÓN.....	32
15	CONCLUSIÓN.....	37
15	GLOSARIO:.....	38
16	REFERENCIAS.....	40

1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de los polifenoles contenidos en el cacao.	11
Figura 2. Polifenoles del tipo Flavonoles contenidos en el cacao. A) (-)-epicatequina. B) Catequina y C) Protoacondinas	12
Figura 3. Proceso de obtención de cascarilla de semillas de Theobroma cacao. Figura de elaboración propia.....	13
Figura 4. Evaluación de temperatura y tiempo optimo en la preparación de la infusión de cascarilla de cacao. se determinó el contenido de fenoles totales en temperaturas de 75 y 95 °C con tiempos de extracción de 10 y 15 minutos.	22
Figura 5. Fermentación del té negro y cascarilla de cacao durante 6 días en dos temperaturas a 30 y 37 °C. Se determinó en los días 0, 1, 3 y 6 los fenoles totales formados.	23
Figura 6 comportamiento del pH del té negro de infusión de cascarilla de cacao. se realizó fermentación a una temperatura de 30° y 37° C durante 6 días.	23
Figura 7. formación de biomasa en temperaturas de fermentación 37° y 30 °C durante seis días en té negro e infusión de cascarilla de cacao. grafica del peso obtenido de tres experimentos realizados por duplicado (A). imágenes representativas de las biomasas obtenidas del té negro y de cascarilla de cacao (B).	24
Figura 8. Detección de minerales en té negro e infusión de cascarilla durante fermentación en 6 días en temperatura de 37 y 30 C. determinación de calcio (A), fosforo (B), magnesio (C), sodio (D), potasio (E) y cloro (F).	27
Figura 9. Determinación de azúcares reductores en té negro e infusión de cascarilla de cacao.....	29
Figura 10. Determinación de proteínas en té negro e infusión de cascarilla durante la fermentación.....	30
Figura 11. Actividad antioxidante por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) de los fermentos de té negro e infusión de cascarilla de cacao a 30 y 37 °C.	32

2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Determinación de cenizas totales en bebida fermentada de té negro y cascarilla de cacao.....	25
Tabla 2. Cantidades de bacterias y levaduras en bebida fermentada de infusión de cascarilla de cacao y té negro.....	31

3 ABREVIATURAS

APD: Agar papa dextrosa

CuSO_4 : sulfato de cobre

DNS: ácido dinitro salicílico

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo.

g/dL: gramos por decilitros

mL: mililitros

N: normalidad

Na_2CO_3 : Carbonato de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

μL : microlitros

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE INFUSIÓN
FERMENTADA DE CASCARILLA DE CACAO**

4 RESUMEN

El cacao se cultiva en muchos países, siendo Tabasco uno de los principales productores nacionales, se le atribuyen efectos benéficos para la salud, además de poseer un agradable sabor. La importancia fitoquímica del cacao son los flavonoides, los cuales ejercen efectos antioxidantes y desinflamatorios al consumirlo, dichos flavonoides, están presentes en hojas, semillas y cascara de semillas, etc.

Para muchos, la parte aprovechable es la semilla y terminan por desechar la cascara, siendo este un desecho agroindustrial, sin embargo, recientemente se han descrito las propiedades que podría ofrecer *Teobroma cacao* L. en materias primas no utilizadas, Investigaciones recientes han ratificado que la ingesta de la infusión de cascara aporta antioxidantes, previene enfermedades cardiovasculares y cancerígenas. Cabe señalar que la producción de alimentos fermentados mejora las características nutricionales y brinda efectos en la salud. La fermentación de los alimentos se ha realizado de forma natural o con el empleo de cultivos iniciadores como es el caso de la kombucha, la cual se produce a través de la fermentación aeróbica de té negro y azúcar mediante una combinación de un consorcio microbiano, conocida como cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY).

Se elaboró una bebida a partir de la cascara de cacao empleada como infusión a través del proceso de fermentación, en la cual se vio una mejora en los efectos sin embargo se deben seguir evaluando sus efectos biológicos.

Palabras claves: *Cacao, Cascara, Kombucha, Fermentación.*

Abstract:

Cocoa is cultivated in many countries, with Tabasco being one of the main national producers, it is attributed beneficial effects for health, in addition to having a pleasant flavor. The phytochemical importance of cocoa are flavonoids, which exert antioxidant and anti-inflammatory effects when consumed, these flavonoids are

present in leaves, seeds and seed shells, etc. For many, the usable part is the seed and they end up discarding the husk, this being an agro-industrial waste, however, the properties that *Teobroma cacao* L. could offer in unused raw materials have recently been described, Recent research has ratified that the intake of husk infusion provides antioxidants, prevents cardiovascular and carcinogenic diseases. It should be noted that the production of fermented foods improves nutritional characteristics and provides health effects. The fermentation of food has been real naturally or with the use of starter cultures such as kombucha, which is produced through the aerobic fermentation of black tea and sugar through a combination of a microbial consortium, known as a symbiotic culture of bacteria and yeast (SCOBY).

A drink was made from cocoa husks used as an infusion through the fermentation process, in which an improvement in the effects was seen, however, its biological effects must continue to be evaluated.

Keywords: *Cocoa, Cascarilla, Kombucha, Fermentation.*

5 INTRODUCCIÓN

El cacao se consume en el mundo por su agradable sabor y por los beneficios que promueven en la salud. Los principales componentes fitoquímicos del cacao son los flavonoides por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Suraci *et al.*, 2018). Los flavonoides del cacao regulan la síntesis y degradación de los lípidos, la homeostasis de la glucosa, reducen el riesgo de trastornos metabólicos, (Díaz-Valderrama *et al.*, 2020) y ejercen propiedades neuro protectoras (Camandola *et al.*, 2019); además, mejora la función endotelial, el aumento del flujo sanguíneo y el suministro de glucosa al cerebro (Álvarez Cilleros, 2020).

Actualmente, la cascarilla de cacao en la industria chocolatera se genera en grandes cantidades, la cual es desechada por desconocimiento o poca valoración como materia prima (Claudia Alexandra, 2015). Hace más de 2500 años, los Mayas notaron que la cascarilla poseía propiedades medicinales y terapéuticas. Sin embargo, con el desarrollo del comercio del chocolate la semilla de cacao desplazó el uso de otras de sus partes.

Investigaciones recientes han ratificado que la ingesta de la infusión de cascarilla aporta antioxidantes, previene enfermedades cardiovasculares y cancerígenas (Teneda Llerena *et al.*, 2019). En Ecuador se reportó que la “cáscara de cacao” es abundante en magnesio y teobromina, útil para tratar la debilidad, diarrea e inflamación (López López, 2013). Además, su consumo sugiere ventajas debido a su alto contenido en fibra dietética (Teneda Llerena *et al.*, 2019). En México la principal producción de cacao se realiza en los estados de Chiapas, Oaxaca y Tabasco. Debido a esto, nuestro trabajo busca caracterizar la infusión de cascarilla de cacao (considerado un residuo agroindustrial), desarrollar una bebida fermentada con efectos positivos en la salud y la generación de un modelo de utilidad a mediano plazo.

6 MARCO TEORICO.

6.1 Flavonoides

Los flavonoides son los principales metabolitos secundarios presentes en las plantas, los cuales otorgan diversos efectos benéficos. Dentro de los flavonoides se encuentran antocianinas, flavonoles y poliamidas. Las antocianinas y los flavonoles se acumulan en los órganos vegetativos; los flavonoles se acumulan en embriones de semillas y las proantocianidinas existen principalmente en la piel, la cáscara y las partes de las semillas que se consumen con menos frecuencia, por lo tanto, su ingesta dietética no es grande (Álvarez Castro & Orallo Cambeiro, 2003). Recientemente, se ha despertado un interés por el consumo de flavonoides en la dieta humana, debido a los efectos antioxidantes que estos metabolitos poseen.

El organismo humano no puede producir flavonoides, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Se estima que la ingesta promedio de flavonoides es de 23 mg/día, siendo predominantes los flavonoles especialmente los del tipo catequinas (Martínez-Flórez et al., 2002)

Por otra parte, se ha descrito que el cacao y sus derivados contienen una fuente rica de polifenoles, que constituyen del 12 a 18% del grano entero. (Bravo, 1998). La cocoa muestra un mayor contenido de polifenoles (65 mg/g) a diferencia del chocolate blanco (15 mg/g) y el chocolate oscuro (36.5 mg/g) (Hii et al., 2009)

Químicamente, los polifenoles son de bajo peso molecular compuestos por dos anillos de benceno (A y B) unidos a través de un enlace de tres carbonos que constituye un anillo heterocíclico (C) (Figura 1), estos poseen un número variable de grupos hidroxilo, incluyendo grupos funcionales como los ésteres, metil ésteres, glucósidos, entre otros, poseen propiedades para la quelación del hierro y otros metales de transición, también se comportan como captadores de radicales libres (scavengers), sus propiedades antirradicalarias se dirigen hacia los radicales hidroxilo y superóxido que participan en la cadena de peroxidación lipídica (Ballester Espigares, 2006)

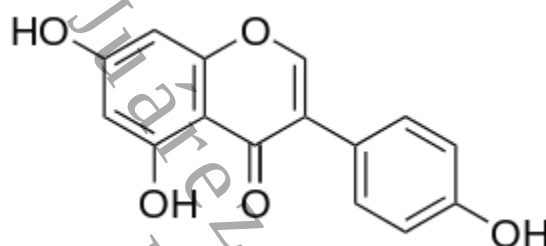
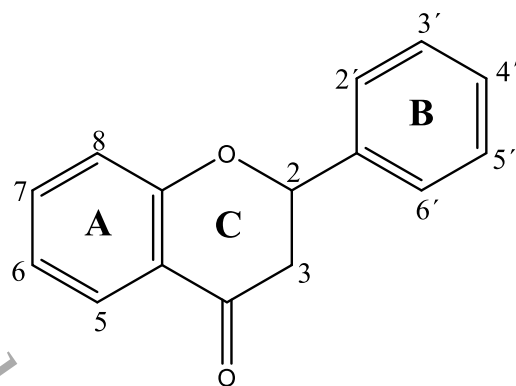


Figura 1. Estructura básica de los polifenoles contenidos en el cacao.

Se han distinguido tres principales grupos de polifenoles contenidos en la cocoa, del tipo flavan-3-ol (-), conocidos como flavonoides. En su forma monomérica están las catequinas (37%) y (-) epicatequina con hasta un 35% de contenido de polifenoles, así como sus formas poliméricas, las antocianinas (4%) y las proantocianidinas (58%) (Vázquez-Ovando et al., 2016).

La Figura 2 muestra la estructura química de los flavanoles, son enantiómeros ya que la posición en el plano espacial del grupo -OH en la (-)-epicatequina se encuentra hacia atrás y en la (+)-catequina hacia adelante del plano que forma la molécula (Valenzuela B, 2007)

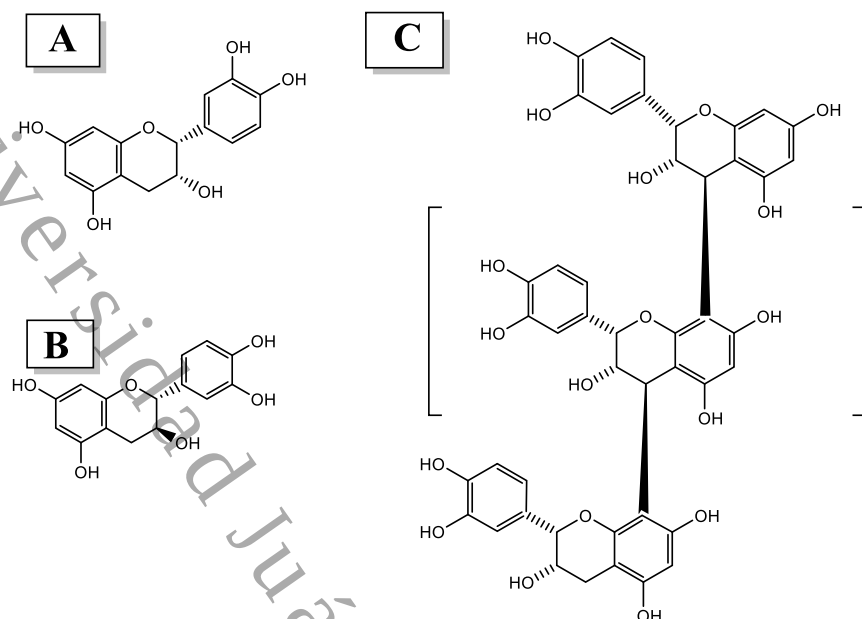


Figura 2. Polifenoles del tipo Flavonoles contenidos en el cacao. A) (-)-epicatequina. B) Catequina y C) Protoancionidinas

Se ha considerado que alimentos como el vino, las frutas, el té verde, el té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra son las principales fuentes de compuestos poli fenólicos, sin embargo, en los últimos años diversos autores (Wollgast & Anklam, 2000) han demostrado que el cacao y sus derivados son buena fuente de estas sustancias. (Perea-Villamil et al., 2009). Inicialmente, fueron consideradas sustancias sin efectos benéficos para la salud humana, sin embargo, se demostraron múltiples efectos biológicos asociados con la actividad antioxidante.

6.2 Efectos asociados a la cascarilla de cacao.

A partir de las semillas de cacao se ha descrito su actividad biológica (Figura 3). La asociación de los efectos del cacao corresponde a la actividad antioxidante de las mismas, éstas se producen sólo a dosis altas, relacionando con diversas actividades: antiinflamatorios, antivirales, antialérgicos y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías (Martínez-Flórez, 2002). Recientemente, se describe las propiedades que podría ofrecer *Teobroma cacao L.* en materias primas no utilizadas, como la cáscara y la cascarilla.

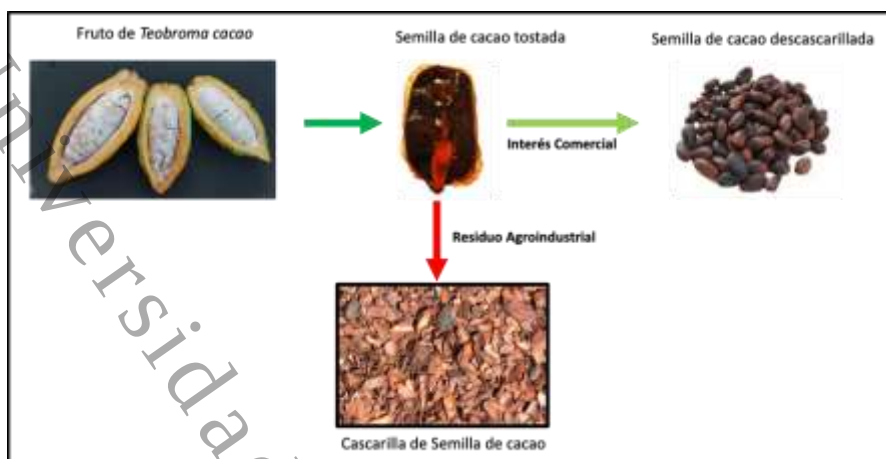


Figura 3. Proceso de obtención de cascarilla de semillas de *Theobroma cacao*. Figura de elaboración propia.

(Teneda Llerena et al., 2019) señalo los beneficios nutricionales y biológicos de la infusión de cascarilla del cacao. La cascarilla de cacao es abundante en magnesio, ácidos oleicos y linoleico, vitaminas y pectinas. De acuerdo con (Sangrois et al., 2014) la cascarilla representa aproximadamente alrededor de 12% del peso de la semilla. La cascarilla posee un pigmento denominado poliflavono glucósido, este es muy requerido por ser resistente a calor y luz, usado como colorante de alimentos (Salem & Guillermo, 2013). En la cascarilla también se han detectados taninos, antocianinas y proantocianidinas, conocidos por su fuerte actividad antioxidante (Jokić et al., 2018).

6.3 Beneficios de la fermentación en los alimentos

La producción de alimentos fermentados mejora las características nutricionales y brinda efectos en la salud. Los alimentos fermentados se definen como alimentos o bebidas producidos a través del crecimiento microbiano controlado y la conversión de los componentes de los alimentos a través de la acción enzimática (Dimidi et al., 2019). Existen varios mecanismos a través de los cuales los alimentos fermentados pueden ejercer efectos beneficiosos en la salud y la enfermedad, contienen microorganismos potencialmente probióticos, como las bacterias del ácido láctico las cuales generan péptidos bioactivos y poliaminas con efectos potenciales sobre la salud cardiovascular, inmunitaria y metabólica (Pessione et al., 2005)

Además, la fermentación puede convertir ciertos compuestos en metabolitos biológicamente activos (Filannino et al., 2015)

La fermentación de los alimentos se ha realizado de forma natural o con el empleo de cultivos iniciadores. En primer lugar, los alimentos se pueden fermentar de forma natural, en los que los microorganismos están presentes de forma natural en los alimentos crudos o en el entorno de procesamiento, y en segundo lugar, los alimentos se pueden fermentar mediante la adición de cultivos iniciadores, conocidos como fermentos dependientes del cultivo, por ejemplo, kéfir, kombucha y natto (Rezac et al., 2018). Los iniciadores que se utilizan para iniciar la fermentación pueden ser naturales o comerciales seleccionados para estandarizar las características organolépticas del producto final (Yann & Pauline, 2014)

La fermentación microbiana es un método de extracción para degradar y separar las paredes celulares que contienen antocianinas, de modo que las antocianinas en las células se disuelven completamente en el extracto, aumentando así el rendimiento y la tasa de extracción de compuestos con actividad biológica. (Wang & Zhao, 2005)

6.4 Fermentación de infusiones herbales.

La kombucha es una bebida del fermento del té negro que se originó en el noreste de China alrededor del año 220 A.C. y se consumió ampliamente durante la dinastía Qin. Posteriormente, bebidas de té fermentado similares se hicieron populares en Rusia y Europa del Este (Vina et al., 2014). En las sociedades modernas, una variedad de bebidas tipo kombucha están disponibles comercialmente, aunque la composición microbiana y de metabolitos de estos productos junto con los métodos de producción rara vez se informan (Coton et al., 2017)

La kombucha tradicional se produce a través de la fermentación aeróbica de té negro y azúcar mediante una combinación de bacterias y levaduras, conocida como cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY). La levadura convierte la sacarosa en etanol que las bacterias del ácido acético convierten en acetaldehído y ácido acético (Dufresne & Farnworth, 2000). La composición microbiana y de metabolitos de la kombucha varía según la composición exacta del SCOBY, la

cantidad de sacarosa, el tipo de sustrato y concentración de té (Acharya & Nummer, 2022) las concentraciones de oxígeno, el tiempo de fermentación (Loncar, E., 2006); la temperatura (De Filippis et al., 2018) y el almacenamiento-duración (Acharya & Nummer, 2022)

Se ha demostrado en estudios con animales que, la kombucha ejerce efectos sobre la glucemia en sangre, (Aloulou et al., 2012) en el estado de estrés oxidativo, (Prasad et al., 2003) en la pérdida de peso inducida por la diabetes, (Morshedi et al., 2006) en la nefrotoxicidad inducida químicamente, (Gharib, 2009) en la disminución de hipercolesterolemia (Yann & Pauline, 2014) y tiene efectos en la ulceración gástrica (Banerjee et al., 2010). Es por esto que , en este trabajo se evaluará el efecto de la fermentación sobre la infusión de la cascarilla de cacao en sus parámetros fisicoquímicos y microbiológicos.

7 JUSTIFICACIÓN

El continuo desequilibrio energético en la alimentación encausa al desarrollo de enfermedades crónicas crónico no transmisibles como: enfermedades del corazón, diabetes mellitus tipo 2, enfermedades cerebro vasculares, obesidad y cáncer. De acuerdo con el Observatorio Mexicano de Enfermedades Crónicas no Transmisibles, en el año 2018, la diabetes fue es la segunda causa de muerte en población mexicana.

El incremento constante del consumo de bebidas hipercalóricas y sus consecuencias en la salud de la población mexicana, ha despertado el interés en el desarrollo de alternativas más saludables. En los últimos años, el consumo de té fermentado ha tomado popularidad debido a que se le ha relacionado con propiedades benéficas para la salud por su efecto antioxidante. No obstante, su consumo en México es limitado y su proceso de obtención es aún muy variable; por lo tanto, son necesario estudios para la estandarización del proceso de fermentación, la caracterización de sus compuestos y el papel de la fermentación en estos productos.

Al ser Tabasco uno de los principales productores de cacao en México y contar con varias industrias chocolateras, se busca innovar con en el uso de la cascarilla de cacao, debido a que para las industrias es considerada un desecho agroindustrial. En este sentido, en el presente estudio se busca elaborar una bebida fermentada a partir de la cascarilla de cacao utilizando un consorcio microbiano disponible comercialmente y evaluar el efecto de la fermentación con la finalidad de mejorar la salud de la población y a mediano plazo generar un modelo de negocio en la región Tabasqueña.

8 HIPÓTESIS

La fermentación mejorará las características fisicoquímicas y microbiológicas de la infusión de cascarilla de cacao.

9 OBJETIVO GENERAL

- Estandarizar el proceso de fermentación y determinar parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de la infusión de cascarilla de cacao.

10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el efecto de la temperatura en la preparación de la infusión sobre los compuestos polifenólicos extraídos.
- 2) Evaluar el contenido de compuestos polifenólicos totales y pH a diferentes temperaturas y tiempos de fermentación de la infusión de cascarilla de cacao.
- 3) Obtener la cantidad de biomasa, cenizas totales, minerales, azúcares reductores y proteínas en la infusión fermentada de cascarilla de cacao.

- 4) Evaluar el crecimiento de bacterias y hongos totales en la bebida fermentada de cascarilla de cacao.
- 5) Determinar la actividad antioxidante en la infusión fermentada de cascarilla de cacao por el método 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

11 MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 Material vegetal

En este estudio se utilizó como control el té negro (*Camellia Sinensis*) de la marca Healthy SuperFood®. La cascarilla de *Teobroma cacao*, fue obtenida de los productores de Cacep® Chocolates de la Hacienda Cacaotera “Jesús María”, ubicada en la rancharía Sur 5ª Sección, camino vecinal Comalcalco-Tulipán, Comalcalco, Tabasco.

11.2 Consorcio microbiano

Consorcio microbiano de Kombucha de la marca MANDOLÍN® Puebla, México.

11.3 Material químico

NaOH, reactivo Folin-Ciocalteu, ácido gálico, 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH), ácido dinitro salicílico (DNS), agar dextrosa y papa (APD), glucosa, extracto de levadura, agar bacteriológico, ácido tartárico y Bacterias Ácido-Lácticas 3M®.

12 MÉTODOS

12.1 Efecto de la temperatura en la extracción de compuestos polifenólicos totales de la infusión.

Para la elaboración de la infusión fermentada, en este proyecto se utilizó como control un fermento a partir de té negro. De acuerdo con (Chakravorty et al., 2016) las temperaturas de infusión a determinar fueron a 75 °C y a 95 °C, la preparación del fermento se realizó a una concentración de 0.8% del material vegetal. Posteriormente, se filtró el contenido de la infusión y se añadió sacarosa una

concentración del 10%. Para la elección de la temperatura en la fermentación de la infusión de cascarilla de cacao el contenido de fenoles totales fue determinado.

12.2 Elaboración de bebidas fermentadas.

Se realizó la fermentación del té de té negro (control) y de la infusión de cascarilla de cacao por medio de la inoculación de colonia simbiótica de levaduras y bacterias (SCOBY, por sus siglas en inglés) de la marca MANDOLÍN® al 10%. La temperatura de incubación fue a 37 °C y a 3, 6, 9, 12 y 15 días. Se determinó el pH, peso de biomasa, densidad y contenido de compuestos polifenólicos. (Jones et al., 2017)

12.3 Determinación de biomasa.

La biopelícula se obtuvo mediante la medición de la biomasa (biopelícula flotante de celulosa), la cual fue removida de la superficie del líquido fermentado y se filtró de acuerdo con el método establecido previamente por Malbaša y colaboradores (2008). (Malbaša et al., 2008)

12.4 Determinación de pH

El pH de las infusiones se midió mediante el uso de un potenciómetro de la marca OAKTON, de acuerdo con la **NOM-F-317-S-1978**, de alimentos y bebidas. (DOF, 1978)

12.5 Determinación de cenizas totales

El contenido de cenizas totales se realizó de acuerdo con lo establecido en la norma mexicana NMX-F-066-S-1978. Se colocó en crisoles de porcelana de peso conocido alícuotas de cada muestra (30 °C y 37 °C), las muestras fueron llevadas a calentamiento en una mufla, marca THERMO SCIENTIFIC a una temperatura de 200 °C por 24 horas. Posteriormente se colocaron en el desecador. Pasado el tiempo de secado se obtuvo la cantidad de minerales por diferencia de peso en una balanza analítica. Las muestras se realizaron por triplicado.

12.6 Determinación de azúcares reductores.

El método para la determinación de azúcares reductores se basa en la detección de la presencia del grupo carbonilo C=O libre de azúcares reductores. (Jain et al., 2020)

12.7 Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Lowry et., al (1951). En tubos de ensayo se colocó 100 μ L de las infusiones. Posteriormente, se adicionó 1 mL de solución cupro-alcalina (50 mL de Na_2CO_3 al 2%, tartrato de sodio al 0.02% en NaOH 0.1 N y 1 mL de CuSO_4 al 5% disuelto en agua destilada), la mezcla se agitó y luego se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se agregó 100 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu 0.5 N, se agitó y se dejó reposar por 45 minutos a temperatura ambiente. Concluidos los 45 minutos, se tomó lectura de las absorbancias a 550 nm en el espectrofotómetro (GENESYS 10UV). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/dL.

12.8 Cuantificación de polifenoles hidrolizables por el método de Folin-Ciocalteu

Se tomó 250 μ L de cada disolución patrón de ácido gálico o del sobrenadante procedente de la extracción de los compuestos polifenólicos en la muestra y se colocó en matraces aforados de 25 mL. Se añadió 15 mL de agua destilada y 1.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, el contenido de los matraces se homogeneizó y se dejó reposar ocho minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se adicionó a cada matraz 3.75 mL de la disolución de carbonato sódico al 7.5 % y se llevó a un volumen de 25 mL con agua destilada. Se Homogeneizaron los matraces y se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas. Concluido el tiempo, se midió las absorbancias a 765 nm. (García Martínez et al., 2015). Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico.

12.9 Determinación de actividad antioxidante.

La determinación se realizó por el método del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH). Es un método útil, rápido y sencillo para determinar la capacidad antioxidante de compuestos de origen natural.

Se preparó una solución de DPPH 100 µM en metanol y se colocó un mililitro en cada tubo, luego a cada uno se le adicionó la cantidad de 35 µL de la muestra de la infusión correspondiente y se mezcló por agitación. Las mezclas se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Transcurrido el tiempo se realizó las lecturas en un espectrofotómetro a 517 nm (Kedare & Singh, 2011)

El porcentaje de actividad antioxidante de las mezclas analizadas se llevó a cabo con la siguiente formula:

$$\%AA = \frac{DO^0 - DM^M}{DO^0} * 100$$

Donde:

%AA= Porcentaje de actividad antioxidante.

DO⁰= Densidad óptica de la muestra sin compuesto

DO^M= Densidad óptica de la muestra con compuesto

12.10 Conteo de bacterias ácido-lácticas.

Se emplearon placas de recuento de Bacterias Ácido-Lácticas 3M[®]. Para la siembra de las muestras el método de dilución en placa fue utilizado 100 µL de las diluciones correspondientes, se colocó en cada placa por duplicado. Las placas se incubaron a 30 °C en una estufa microbiológica marca ECOSHEL por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se llevó a cabo el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

Para el recuento se utilizaron las placas de Bacterias Ácido-Lácticas 3M[®]. El método de dilución en placa fue utilizado. En cada placa se colocaron 100 µL de las diluciones correspondientes, y se realizó por duplicado. Las placas se incubaron a 30 °C en una estufa microbiológica marca ECOSHEL por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se llevó a cabo el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

12.11 Conteo de bacterias acido-acéticas.

Se utilizó el medio GY (5% glucosa, 1% extracto de levadura y 1.5 % de agar bacteriológico) con natamicina (100 mg/L). La siembra de las muestras se realizó mediante el método de dilución en placa. 100 μ L de las diluciones correspondientes se colocaron en cada placa por duplicado. Las placas se incubaron a 30 °C por 72 hr. Concluido el tiempo de incubación las colonias se contaron. (Vázquez et al., 2014)

)

12.12 Conteo de levaduras.

Se utilizó el medio ADP (Agar papa dextrosa). La siembra de las muestras se realizó mediante el método de dilución en placa. 100 μ L de las diluciones correspondientes se colocaron en cada placa por duplicado. Las cajas se incubaron a 25 °C por 5 días. Concluido el tiempo de incubación las colonias se contaron de acuerdo con la NOM-111-SSA1-1994. (DOF, 1994)

12.13 Análisis estadístico

Los resultados se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Se realizó un análisis de comparación de medias empleado la prueba de Tukey. Para el análisis se utilizó el programa Prism 5.0.

13 RESULTADOS

13.1 Temperatura de extracción de compuestos polifenólicos de la infusión de cascarilla de cacao

Para determinar la cantidad de compuestos fenólicos, se utilizó la técnica de fenoles que se describe en la metodología. Se realizaron dos extracciones, una a 75 y otra a 95 °C por 10 y 15 minutos. En la extracción de fenoles totales de los sustratos de té negro (control) y cascarilla de cacao, a la temperatura de 75 °C el té negro se obtuvo la mayor extracción a los 10 min. Por otra parte, en el caso de la cascarilla

de cacao se observó valores muy similares en las condiciones evaluadas. (Figura 4).

Estandarización de temperatura y tiempo en la preparación de infusión de cascarilla de cacao

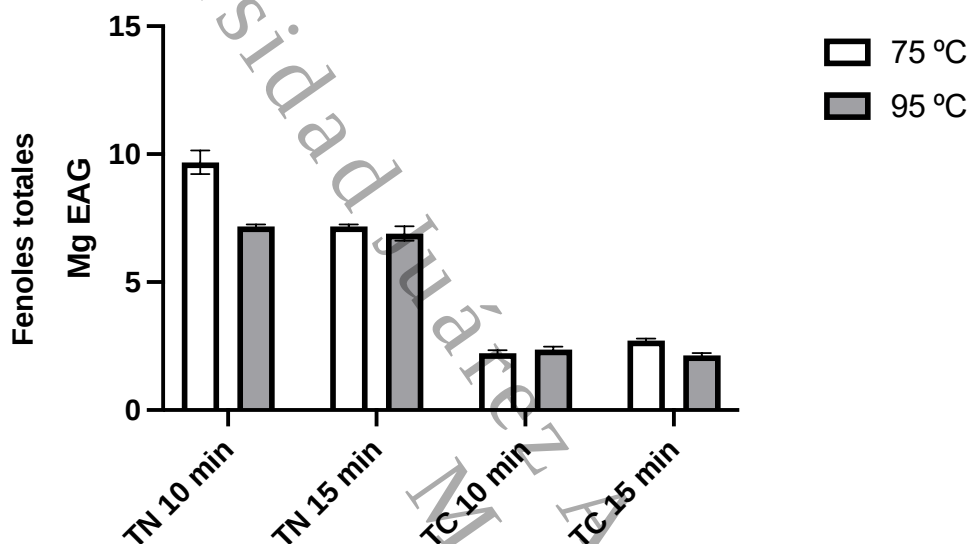


Figura 4. Evaluación de temperatura y tiempo óptimo en la preparación de la infusión de cascarilla de cacao. se determinó el contenido de fenoles totales en temperaturas de 75 y 95 °C con tiempos de extracción de 10 y 15 minutos.

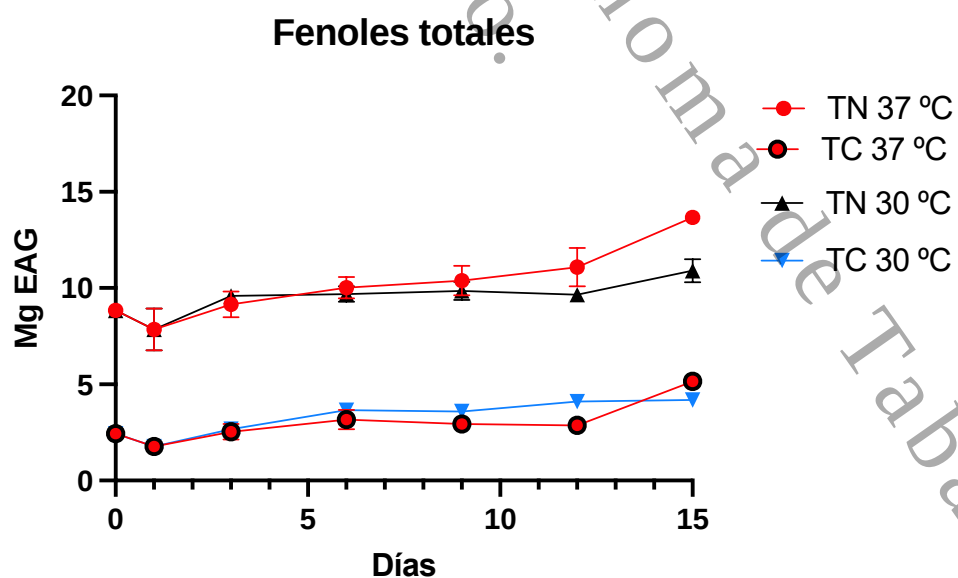


Figura 5. Fermentación del té negro y cascarilla de cacao durante 6 días en dos temperaturas a 30 y 37 °C. Se determinó en los días 0, 1, 3 y 6 los fenoles totales formados.

Después de establecer las condiciones de extracción (95 °C/10 min) de la infusión, se evaluó el efecto de la fermentación en los compuestos polifenólicos. Los resultados mostraron un aumento en los compuestos polifenólicos en la fermentación (Figura 5). De hecho, no se observó diferencias estadísticamente significativas en las condiciones de temperaturas evaluadas en la fermentación.

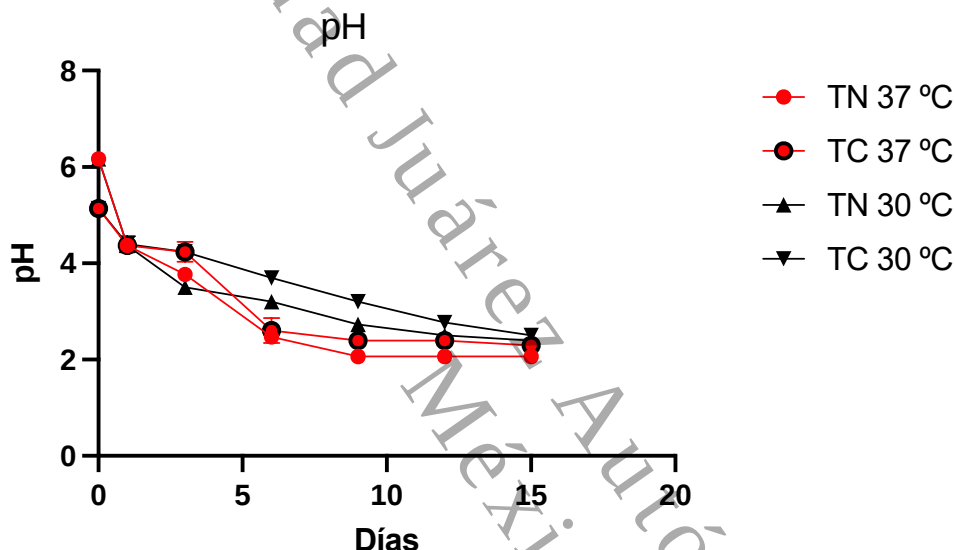


Figura 6 comportamiento del pH del té negro de infusión de cascarilla de cacao, se realizó fermentación a una temperatura de 30° y 37° C durante 6 días.

Uno de los parámetros considerados para el consumo humano de bebidas fermentadas es su acidez, de acuerdo con la FDA el pH adecuado para el consumo se encuentra en el rango de 2.5 – 4. En la gráfica se observa durante el día 0 como las bebidas rondan por arriba de 5 y 6 de acidez. Sin embargo, al evaluar el pH durante el tiempo de fermentación se observó que en la infusión de cascarilla de 37°C en el día 1 tiene un pH de 4.3 y desciende a un pH de 2.6 en el día 6. Por otra parte, la infusión de cascarilla a 30 °C inicia con un pH de 4.4 y culmina con un pH de 3.7. Pasando los el día 6 el pH de las bebidas se encuentran por debajo de 2.5. De acuerdo con la FDA el consumo de bebidas fermentadas sugiere que las dos

condiciones de fermentación se encuentran dentro del rango adecuado, por lo que, las determinaciones de este trabajo se realizaron únicamente hasta el día 6.

Se ha descrito que, la biomasa que se forma en la fermentación está asociada con el aumento de los microorganismos, (Benalcazar Bassante, 2018), y que estos microorganismos son considerados probióticos por afectar positivamente la microbiota intestinal (Wang & Zhao, 2005). En nuestros resultados de la evaluación de biomasa del té negro, predomina la biomasa que se mantuvo a 30° C (0.2140 g) en comparación a 37 °C (0.1170 g). Además, en la infusión de cascarilla la biomasa con mayor peso fue la obtenida a 37 °C (0.3210 g) en comparación con la formada a 30 °C (0.2070 g). Sin embargo, el peso de biomasa en la infusión de cascarilla de cacao y de té negro a 30 °C fue similar, pero la obtenida de la infusión de cascarilla de cacao tuvo menor cantidad de compuestos polifenólicos (Figura 7).

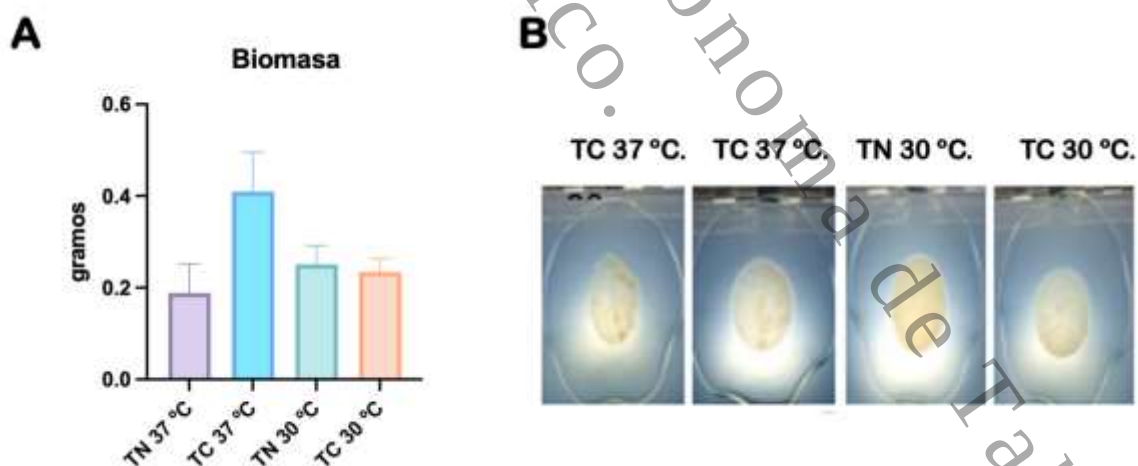


Figura 7. formación de biomasa en temperaturas de fermentación 37° y 30 °C durante seis días en té negro e infusión de cascarilla de cacao. grafica del peso obtenido de tres experimentos realizados por duplicado (A). imágenes representativas de las biomazas obtenidas del té negro y de cascarilla de cacao (B).

13.2 Determinación de Minerales

En la determinación de cenizas totales, podemos hallar la cantidad de minerales totales presentes en las muestras. En la tabla 1 se muestra los g/mL de cenizas totales presentes en las bebidas elaboradas, ambas se sometieron en una mufla a temperatura de 200 °C por 24 horas, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas. Por lo tanto, se determinó el contenido de los minerales de forma individual en las condiciones planteadas para conocer las diferencias en los niveles de los minerales (Figura 8).

Tabla 1. Determinación de cenizas totales en bebida fermentada de té negro y cascarilla de cacao.

Muestras	0 días (gr/mL)	3 días (gr/mL)	6 días (gr/mL)
TN 37 °C	0.0332 ± 0.001	0.0262 ± 0.0004	0.0217 ± 0.0007
TC 37 °C	0.0311 ± 0.001	0.0223 ± 0.0008	0.0218 ± 0.0005
TN 30 °C	0.0212 ± 0.0009	0.0086 ± 0.0005	0.0144 ± 0.001
TC 30 °C	0.0369 ± 0.001	0.0310 ± 0.0009	0.0285 ± 0.0007

Datos expresados como promedio ± desviación estándar.

El calcio puede ser importante para la calidad y la seguridad de la fermentación ya que es un nutriente esencial para el crecimiento y la salud de las células presentes. La falta de calcio en el medio de fermentación puede afectar negativamente el crecimiento y la actividad de las bacterias y levaduras, lo que puede resultar en una fermentación incompleta y una menor calidad de la bebida. En la figura 8A podemos ver que en el día cero la concentración de calcio está por arriba de los 8 mg/dL.

Conforme pasan los días de la fermentación notamos una disminución considerable de calcio. Sin embargo se observa que la fermentación en la temperatura de 37° C presentó valores más altos de calcio en comparación con la fermentación a 30°C para ambos sustratos. En la infusión de cascarilla a 37° en el día uno se observó una cantidad de calcio menor (0.85 mg/dL) en comparación a la infusión de cascarilla a 30° (0.96 mg/dL). Durante el día 3 se observa una disminución de calcio en ambas infusiones, pero en la infusión de cascarilla a 37° es más notable la disminución que en la infusión a 30° (0.51 mg/dL vs 0.82 mg/dL). Sin embargo, en el día seis hay un aumento significativo de calcio en la infusión de cascarilla a 37°, mientras que en la infusión a 30° hay un aumento, pero no es tan significativa (2.4, mg/dL vs 1.09 mg/dL).

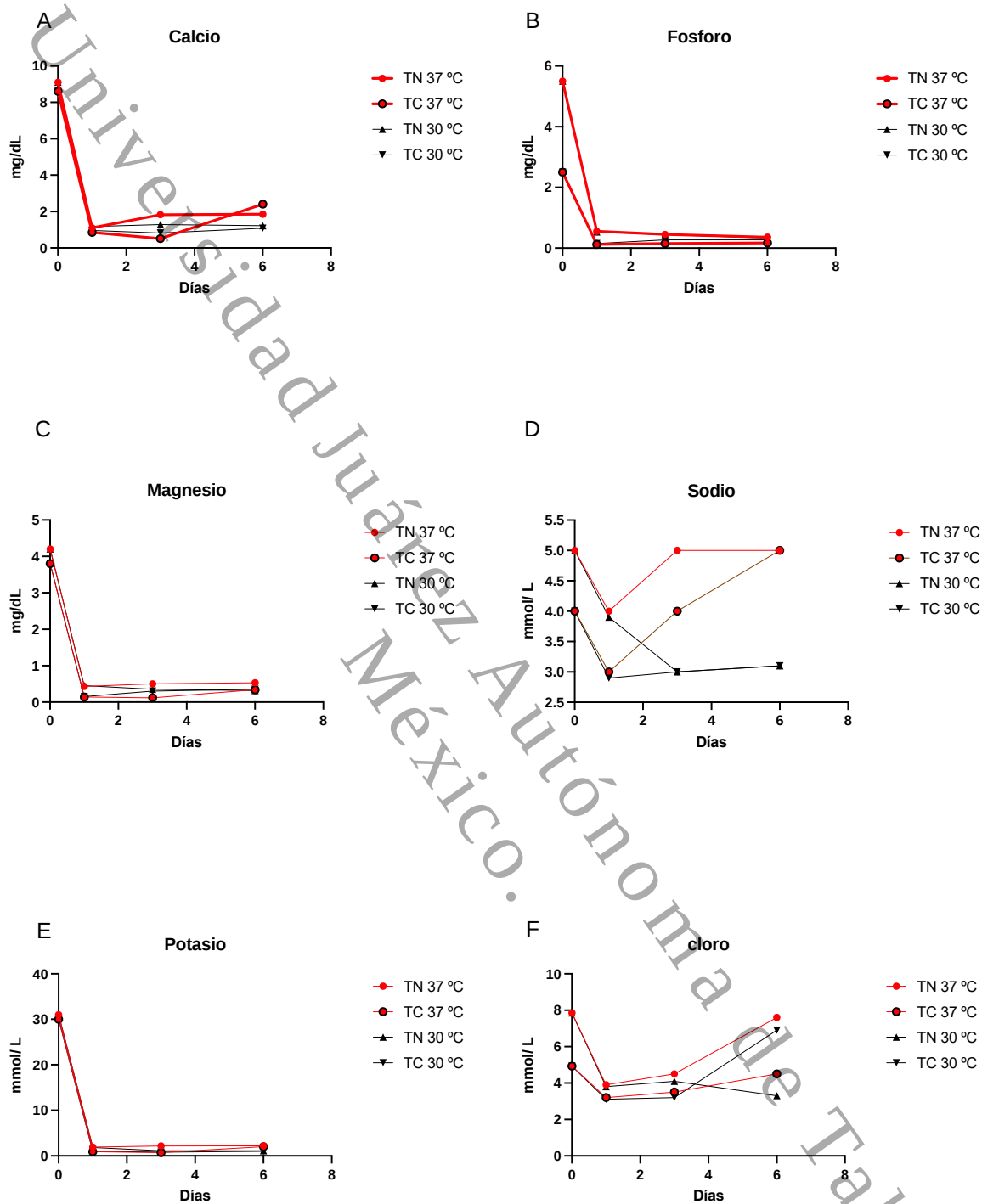


Figura 8. Detección de minerales en té negro e infusión de cascarilla durante fermentación en 6 días en temperatura de 37 y 30 C. determinación de calcio (A), fosforo (B), magnesio (C), sodio (D), potasio (E) y cloro (F).

En la figura 8B se observa el comportamiento del fosforo, él fosforo juega un papel importante en muchos procesos biológicos, incluyendo la síntesis de ácidos nucleicos y la producción de energía celular. La concentración de fósforo del día 0,

tanto en la infusión de cascarilla como en el té negro, es mayor en comparación a los días posteriores a la fermentación, ya que la cantidad de fosforo presente en la infusión de cascarilla es mayor a 2mg/dL y la de té negro está por arriba de los 4mg/dL. Pasando el día 1 se observa una disminución significativa en los niveles de fosforo en las bebidas, sin embargo con el paso de los días se observa un ligero aumento en los niveles de fosforo en las infusiones de cascarilla a 30° (en el día 1 disminuyó a 0.15 mg/dL, aumentando a 0.27 mg/dL en el día 6) y 37°C (disminuyó a 0.12 mg/dL y aumentó a los 6 días con 0.17 mg/dL).

En esta figura 8C encontramos que la mayor cantidad de magnesio es registrada en el día 0. Por otra parte observamos que ambas infusiones de cascarilla tienen un comportamiento similar en los días 1 y 6. (TC 37° día 1: 0.14 mg/dL, día 6: 0.15 mg/dL vs TC 30° día 1: 0.15 mg/dL, día 6: 0.35 mg/dL). Sin embargo, en el día 3 observamos que la manera en que el magnesio se comporta es significativa ya que en la infusión de 37° disminuye a 0.12 mg/dL mientras que en la infusión de cascarilla a 30° aumenta a 0.35 mg/dL. De manera que entre ambas infusiones hay una diferencia de 0.18 mg/dL aun siendo ambas del mismo día.

En la figura 8D, en el día 0 nos encontramos en un rango de concentración de sodio de 4.0 mmol/L a 5.0 mmol/L. Posterior al día 1 de fermentación se observó que el comportamiento entre ambas condiciones es el mismo debido a que ambas infusiones de cascarilla aumentan en los días 3 y seis, sin embargo, el aumento en la infusión de 37° C es mayor en que la de 30° C.

TC37° (DÍA 3: 4 mmol/L, DÍA 6: 5 mmol/L) VS TC30° (DÍA 3: 3 mmol/L, DÍA 6: 3.1 mmol/L). Tanto el sodio como el potasio son electrolitos que juegan un papel importante en la regulación del equilibrio de líquidos en el cuerpo y el funcionamiento adecuado de los músculos y los nervios. En la figura 8 E se registra en el día 0 una concentración de 30 mmol/L de potasio, en todas las bebidas. Posterior al día 0, vemos la disminución de potasio, aunque se observa que en el té negro a 37° C se mantiene una mayor cantidad de potasio en comparación del té a negro a 30° C. A diferencia del té negro, la infusión de cascarilla a una temperatura de 37° posee una menor cantidad de potasio durante los días 1 y 3 (1: 0.93mmol/L;

2: 0.72mmol/L) en comparación de la infusión de cascarilla a 30 °C (1: 1.02mmol/L, 3: 0.83mmol/L). Sin embargo, se observa un aumento considerable en el día 6 en la infusión de cascarilla a 37 °C (2.02mmol/L) mientras que en día 6 de la infusión de cascarilla descendió (1mmol/L) quedando en un valor menor que el del día 1.

En el gráfico 8F podemos observar que en el té negro a 37° C hay mayor cantidad de cloro desde el día 0 en comparación del té negro a 30°C. También podemos ver como hay una disminución y posteriormente se vuelve a ver un aumento llegando casi a los valores iniciales. A pesar de que en ambas temperaturas ascienden conforme pasan los días, se registra un mayor valor en el té de 37°.

Por otro lado, en las infusiones de cascarilla se reporta el mismo comportamiento, es decir conforme pasan los días, la cantidad de cloro aumenta tanto en el TC a 37° como en el TC a 30°, con la diferencia de que en la infusión de cascarilla hay más concentración de cloro.

13.3 Determinación de azúcares reductores

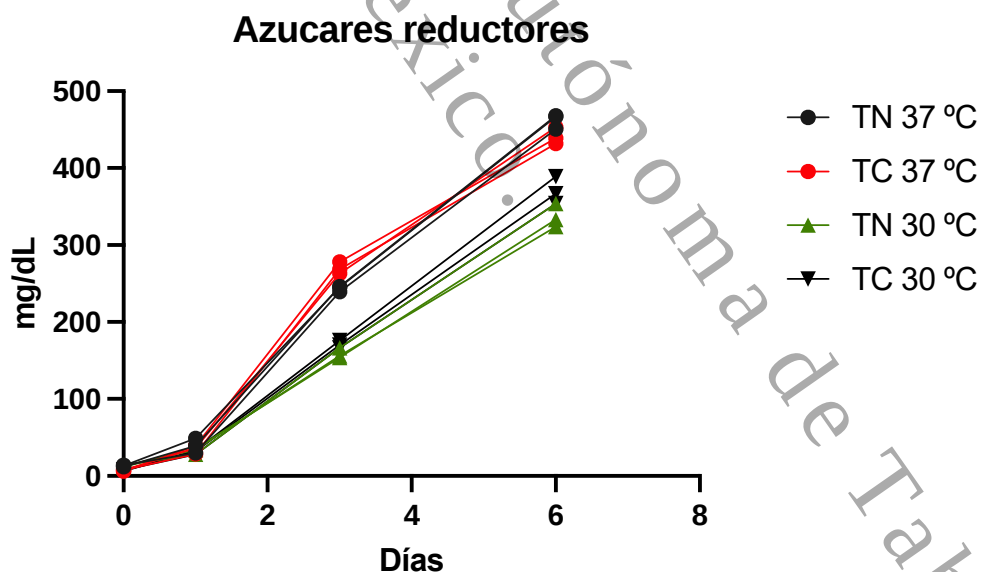


Figura 9. Determinación de azúcares reductores en té negro e infusión de cascarilla de cacao.

En la figura 9 vemos que la menor concentración de azúcar se registra en el día 0 (té negro 13.03 y infusión cascarilla 7.12 mg/dL). Posterior al día 0 podemos ver

como aumenta, conforme van pasando los días de la fermentación. La infusión de cascarilla a 37 °C muestra una mayor concentración de azúcares reductores que la infusión a 30 °C. Los valores obtenidos a 37 °C se sitúan entre 400 y 500 mg/dL, mientras que los obtenidos a 30 °C no superan los 400 mg/dL.

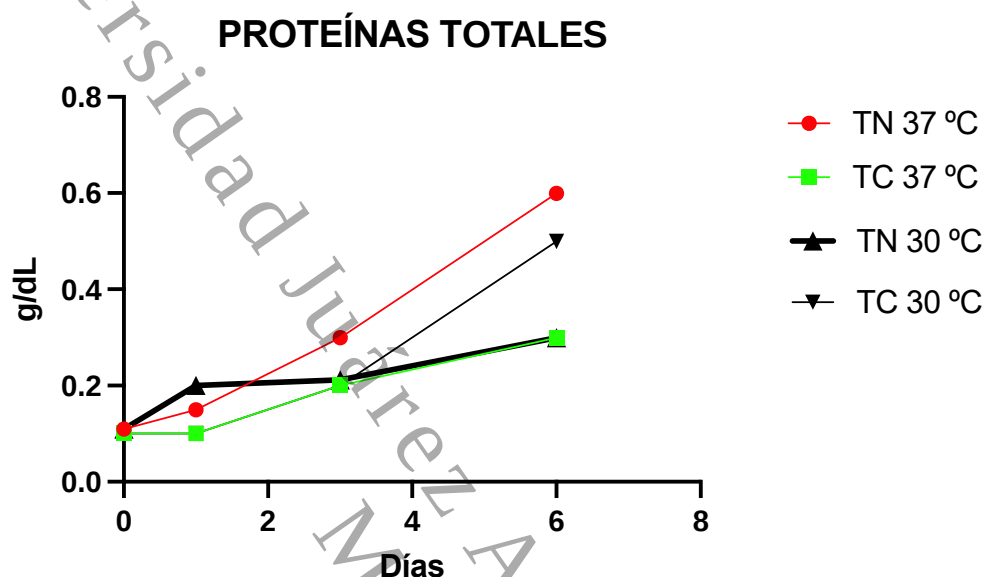


Figura 10. Determinación de proteínas en te negro e infusión de cascarilla durante la fermentación.

Durante el proceso de fermentación, algunas proteínas pueden ser descompuestas en aminoácidos más simples por las enzimas producidas por los microorganismos y sintetizar aminoácidos a partir de nutrientes disponibles en el medio ambiente. En la evaluación de proteínas presentes en la bebida fermentada, en la figura 10 se observó que en el día 0 hay una menor concentración de proteínas en comparación al resto de los días del proceso de fermentación. En las infusiones de cascarilla la misma cantidad de proteína (0.1 g/dL en el día 1 y 0.2 g/dL en el día 3). En el día 6 aumentó la cantidad de proteína en la infusión de cascarilla a 37 °C (0.3 g/dL), sin embargo, la infusión de cascarilla a 30° presenta una mayor cantidad de proteína (0.5 g/dL) en comparación a la infusión de cascarilla a 37 °C. De hecho, al evaluar la distribución de los microorganismos en diferentes temperaturas de fermentación se observó diferencias en la distribución de las bacterias y levaduras (Tabla 3). En las levaduras en la infusión de cascarilla de cacao, presenta mayor número de UFC

(Unidad formadora de colonia) en comparación al té negro, sin embargo, en la cuantificación de UFC de bacterias el té negro presenta mayor número en temperatura de fermentación de 30°C, mientras que en la temperatura de 37 °C no se observa variaciones significativamente estadísticas (Tabla 3).

Tabla 2. Cantidades de bacterias y levaduras en bebida fermentada de infusión de cascarilla de cacao y té negro.

	BACTERIAS (Log UFC mL ⁻¹)	LEVADURAS (Log UFC mL ⁻¹)
TN 30 °C	6.45 ± 0.001	5.15 ± 0.005
TC 30° C	5.30 ± 0.001*	5.65 ± 0.006
TN 37° C	6.02 ± 0.005	5.13 ± 0.003
TC 37° C	6.27 ± 0.008	5.53 ± 0.001

Valores expresados como promedio ± desviación estándar. Experimentos realizados por triplicado. * prueba de t-student TN 30 °C vs TC 30 °C $p \leq 0.05$.

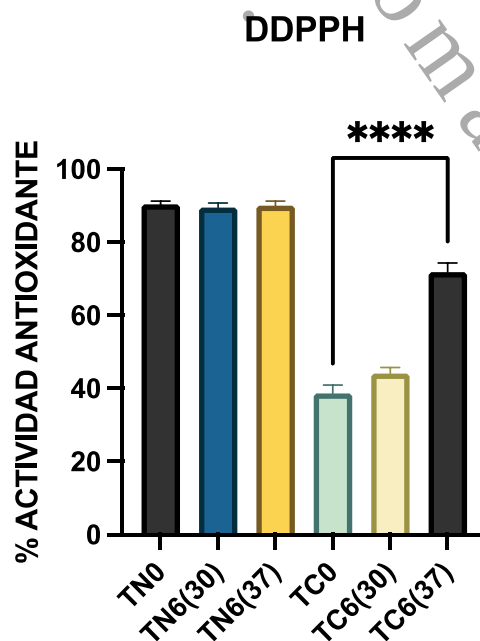


Figura 11. Actividad antioxidante por el método del radical 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH) de los fermentos de té negro e infusión de cascarilla de cacao a 30 y 37 °C.

Posteriormente, se determinó la actividad antioxidante, se observó que la distribución de microorganismos en el té negro no afecta en la actividad antioxidante (Figura 11). Con respecto a la infusión de cascarilla de cacao se observó que los microorganismos que se desarrollan en la temperatura de 37 °C en la fermentación de la cascarilla de cacao favorece la actividad antioxidante. Inicialmente se presentó 36.19% de actividad antioxidante en día 0, transcurridos seis días de fermentación bajo las temperaturas a 30 °C y a 37 °C, presentaron el 45.71% y 74.76% de actividad antioxidante respectivamente. Por lo tanto, la fermentación a temperaturas de 37°C de la infusión de la cascarilla de cacao aumento 2 veces el porcentaje de la actividad antioxidante en 6 días de fermentación.

14 DISCUSIÓN

En este trabajo, se observó que la mejor temperatura para la extracción de polifenoles de la infusión de cascarilla de cacao fue a 95 °C (Figura 4). Este resultado concuerda con un estudio previo en el que se comparó la extracción de polifenoles en diferentes marcas de té verde a distintas temperaturas, encontrando que a mayor temperatura se obtenía mayor cantidad de polifenoles. Estos hallazgos sugieren que la infusión de cascarilla de cacao puede ser aprovechada como una fuente natural de polifenoles. Sin embargo, es necesario que se realicen otros estudios que permitan caracterizar e identificar los compuestos polifenólicos presentes.

Por otra parte, la fermentación se asocia con el aumento de beneficios a la salud. Se ha reportado, que la bebida fermentada de té negro conocida como Kombucha contribuye con un microbiota saludable debido a que aporta microorganismos probióticos y compuestos polifenólicos (Chakravorty 2016). Sin embargo, dentro de las características de la fermentación son importantes las condiciones adecuadas para el consumo humano, como los niveles del pH los cuales de acuerdo con la

FDA no deben ser menor a 2.5. En nuestros resultados (Figura 6), se puede observar que tanto en la infusión de cascarilla fermentada a 37 °C como a 30 °C, hay una disminución significativa del pH en el día 6, el cual coincide con lo reportado sobre el comportamiento del pH en la fermentación del té negro, que oscila en un rango de 3.5 a 2.5 después de 7 días (De Filippis et al., 2018). De hecho, la infusión de cascarilla en las temperaturas evaluadas coincide con lo permitido por la FDA para el consumo humano.

En nuestra bebida también se evaluaron las cantidades de nutrientes inorgánicos esenciales para el organismo, estos nutrientes se clasifican en macrominerales y microminerales, según la cantidad que se desea consumir. En este trabajo nos centramos en los macrominerales, entre los que se encuentran el calcio, el fósforo, el magnesio, el sodio, el potasio y el cloro. (Carbajal Azcona, 2017). Estos elementos tienen funciones estructurales y reguladores de los procesos corporales (OPS/OMS, 2016). Por ejemplo, el calcio es importante para la salud ósea y muscular, y se recomienda una ingesta de 1.2 mg/día (Martínez de Victoria, 2016). El sodio, por su parte, interviene en el equilibrio hídrico y la presión arterial, y se aconseja limitar su consumo a 2 g/día en adultos, ya que un exceso puede provocar hipernatremia (Asunción Mar, 2021) y enfermedades cardiovasculares (Caracas, dic. 2015).

El magnesio (Mg) es un mineral esencial para el organismo, que participa en numerosas reacciones enzimáticas y en la comunicación entre las células nerviosas y musculares (Council et al., 1989). También regula el ritmo cardíaco, la tensión arterial, la respuesta inmunitaria, la salud ósea y el equilibrio de la glucosa en sangre (Bielik & Kolisek, 2021). El microbiota intestinal influye en la absorción y el aprovechamiento del Mg. Un consumo adecuado de Mg podría favorecer una microbiota más diversa y equilibrada, lo que a su vez podría prevenir trastornos metabólicos relacionados con el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2 (Pluriti et al., 2021).

Otros minerales que forman parte de los electrolitos son el sodio, el cloro y el potasio. Estos electrolitos intervienen en el funcionamiento de la membrana celular

y en la generación de señales nerviosas y la activación de enzimas que regulan diferentes procesos metabólicos intracelulares (Soliz Rivero et al., 2021) Según se muestra en la figura 8 de los resultados, la bebida analizada contiene estos minerales, aunque en cantidades inferiores a las recomendadas para su ingesta. Sin embargo, su contribución puede ser útil como complemento de una dieta equilibrada.

Por otra parte, se analizaron los valores de azúcares reductores durante la fermentación. Los azúcares reductores son carbohidratos o azúcares naturales que tienen un grupo aldehído o cetona libre (Yana Yanqui et al., 2019). Estos azúcares se consumen durante la fermentación, una bebida no alcohólica según la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, que establece que debe tener menos de 2.0 % de alcohol etílico en volumen (DOF, 2018). La mayoría de los tés fermentados en el mercado tienen menos de 0.5 % de alcohol. Esto se debe a la acción simbiótica de las bacterias y las levaduras que forman la bebida fermentada. Las bacterias no pueden usar la sacarosa, pero sí la glucosa y la fructosa, que son producidas por las levaduras al romper la sacarosa. Por eso, las bacterias y las levaduras se benefician mutuamente. En nuestra infusión de cascarilla de cacao, usamos el consorcio simbiótico de la marca MANDOLIN KOMBUCHA para fermentar el té endulzado.

Según la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, los productos preenvasados con más del 10% de azúcares libres añadidos deben llevar la leyenda “exceso de azúcares”. Nuestra infusión de cascarilla de cacao se preparó con el 10% de sacarosa, pero después de la fermentación se redujo el contenido de azúcar. Esto se debe a que las bacterias degradaron los productos secundarios que se formaron a partir de la glucosa y la fructosa, que se liberaron al hidrolizarse la sacarosa. Por eso, nuestra infusión de cascarilla de cacao se puede etiquetar como “reducido en azúcar”.

De acuerdo a la NOM-086-SSA1-1994, “los productos con menor contenido de azúcar son aquellos a los que se les ha reducido parcial o totalmente el azúcar”, (DOF, 1996). Estos productos se clasifican como “sin azúcar” si contienen menos de 0,5 g/porción. Nuestros resultados muestran que la infusión de cascarilla de cacao tiene 0,4 g por cada 100 ml.

En relación con los niveles de proteínas después de la fermentación (figura 10), se encontró que el contenido proteico es bajo y puede estar asociado con el tiempo de fermentación. De acuerdo con Jayabalan et al., reportó que la bebida fermentada de té negro después de 21 días de fermentación (presenta un 23 % de proteína con presencia de aminoácidos esenciales y no esenciales) y se podría utilizar como una rica fuente de proteína microbiana (Jayabalan et al., 2010).

La palabra probiótico significa “a favor de la vida” y hace referencia a “microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al huésped efectos saludables”. De este concepto se pueden enfatizar tres características fundamentales: la viabilidad de los microorganismos, su cantidad de consumo y el beneficio que proveen al huésped. (FAO & OMS, 2006) Estos microorganismos además del aporte en nutrientes pueden ser considerados benéficos en alimentos y bebidas. De acuerdo a Guzmán Ortiz, en bebidas comerciales se requiere una concentración de 1×10^6 a 1×10^9 UFC/porción de cepas probióticas para hacer un uso correcto a la declaración de la propiedad "contiene probióticos", en nuestros resultados la infusión de cascarilla de cacao a una temperatura de 37 °C contiene los microorganismos suficientes para ser considerada una bebida que contiene probióticos (Tabla 3). Esta concentración es requerida debido a que la viabilidad de los microorganismos puede verse afectada durante su paso por el tracto gastrointestinal (TGI), en donde se enfrentan a ambientes hostiles como cambios drásticos de pH, presencia de enzimas y sales biliares. (Guzmán Ortiz, 2021)

La formación de biomasa es una cualidad importante en un probiótico, ya que se ha evidenciado que esta propiedad puede favorecer la supervivencia del microorganismo ante las condiciones del tracto gastrointestinal. Al evaluar la biomasa en la infusión de cascarilla de cacao, se observa que la biopelícula crece a ambas temperaturas, lo que indica que cumple con el requisito principal de un probiótico (Figura 6). Además, se ha reportado que la biopelícula generada por

algunos probióticos tiene efectos inmunomoduladores y capacidad de inhibir el desarrollo de patógenos. (Aoudia et al., 2016)

El microbiota intestinal es el término que define al ecosistema microbiano del intestino, que incluye especies nativas que colonizan permanentemente el tracto gastrointestinal y una serie variable de microorganismos vivos que transitan temporalmente por el tubo digestivo. Las bacterias nativas se adquieren al nacer y durante el primer año de vida, mientras que las bacterias en tránsito se ingieren continuamente a través alimentos, bebidas, etc. Se habla de simbiosis cuando la relación entre dos o más especies vivas conlleva beneficios para al menos una de ellas sin que exista perjuicio para ninguna de las otras. La relación del anfitrión con su flora es de simbiosis: el anfitrión proporciona espacio y nutrición y el microbiota contribuye de modo importante a la fisiología del anfitrión. (Aguilera Garca et al., 2017). La alteración en la composición del microbiota intestinal se denomina disbiosis. La disbiosis predispone a enfermedades inflamatorias y se asocia con el incremento de radicales libres y el desarrollo del estado de estrés oxidativo. (Weiss & Henet, 2017)

La determinación de la capacidad antioxidante es útil para valorar la calidad de un alimento, la cantidad de antioxidantes presentes en un sistema, o la biodisponibilidad de compuestos antioxidantes en el cuerpo humano debido a que ayudan a prevenir efectos adversos relacionados con los radicales libres. (Benítez-Estrada et al., 2020) El estrés oxidativo surge por el aumento de ROS/RNS y una disminución de la habilidad de protección antioxidante, caracterizado por la reducción en la capacidad de los sistemas endógenos para combatir los ataques oxidativos dirigido a blancos biomoleculares. Su gravedad se asocia con varias patologías, como enfermedades cardiovasculares, cáncer diabetes y vejez. (Hidalgo & Rubio, 2018) Los antioxidantes se encuentran presentes en alimentos y bebidas a base de extractos vegetales, como es el caso de la bebida de té negro fermentada, donde (Chakravorty 2016) reportó un incremento en la actividad antioxidante del té negro después de unos días de fermentación, indicativo de ser una bebida rica en antioxidantes. Además, describe el aumento de monómeros de flavonoides puede

deberse al consorcio microbiano que se genera con los sustratos utilizados, dando lugar al aumento de fenoles totales y por consecuencia al aumento de la actividad antioxidante. Podemos observar en nuestros resultados que la actividad antioxidante mostró un comportamiento similar en la fermentación a 37 ° C (Figura 11). En este sentido, la bebida fermentada a partir de cascarilla de cacao puede ser considerada candidata idónea como alimento funcional, debido a su contenido de microorganismos vivos, capacidad de formación de biopelícula, contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante. Sin embargo, es necesario continuar con los estudios que permitan caracterizar los microorganismos presentes y la identificación de metabolitos de importancia biológica.

15 CONCLUSIÓN

Finalmente, y de acuerdo a nuestros resultados podemos decir que nuestra infusión de cascarilla de cacao tiene comportamiento similares a los que tiene la bebida fermentada de té negro, esto bajo las condiciones previamente establecidas, por lo que determinamos que la bebida fermentada a base de cascarilla de cacao puede ser considerada candidata idónea como alimento funcional, debido a su alto crecimiento de microorganismos vivos, los cuales en cantidades adecuadas pueden ejercer efectos benéficos para la salud del huésped, y de acuerdo a nuestros resultados cumple con la cantidad mínima necesaria de probióticos para ser considerado funcional. Además, al ser Tabasco uno de los mayores productores de cacao, nos permite darle un valor agregado a la producción del cacao, si bien nuestro proyecto se realizó con el sustrato de cascarilla de cacao considerado para la población en general un “desechos agroindustriales” lo que nos permitió aprovechar dicho desecho para innovar o aprovechar tal recurso y dar a conocer los efectos benéficos que tiene y que actualmente se ha desperdiciado desde hace mucho tiempo puesto que la población desconoce los beneficios de la cascarilla de cacao

15 GLOSARIO:

Alimentos fermentados: alimentos o bebidas producidos a través del crecimiento microbiano controlado y la conversión de los componentes de los alimentos a través de la acción enzimática

Antocianinas: Pigmentos solubles en agua que pertenecen a la familia de los flavonoides.

Biomasa: Fracción biodegradable de productos, desechos y residuos orgánicos.

Cacao: Fruta obtenida del árbol cacao, cuyo nombre científico es *Theobroma cacao*.

Catequinas: Sustancia antioxidante derivada de los polifenoles.

Consorcio microbiano: asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo.

Crecimiento microbiano: incremento en el número de células microbianas de una población.

Cultivo iniciador: preparaciones que contienen microorganismos vivos aplicados con el objeto de hacer uso de su metabolismo microbiano.

Enantiómeros: compuestos con la misma secuencia de enlaces, pero con diferente ordenación en el espacio.

Fermentación: proceso catabólico de oxidación incompleta, totalmente anaeróbico, siendo el producto final un compuesto orgánico.

Flavonoides: Metabolitos secundarios presentes en los vegetales encargados de brindar color a las frutas y verduras.

Infusión: Bebida que se prepara hirviendo o echando en agua muy caliente alguna sustancia vegetal, como hojas, flores, frutos o cortezas de ciertas plantas, y dejándola unos minutos de reposo.

Kombucha: Bebida fermentada de té negro.

Levadura: Hongo unicelular que produce enzimas capaces de provocar la fermentación alcohólica de los hidratos de carbono.

pH: medida que sirve para establecer el nivel de acidez o alcalinidad de una disolución

Polifenoles: grupo de sustancias presentes en las plantas con una alta capacidad antioxidante.

Proantocianidinas: son polímeros de flavanoles-3, también conocidas como "taninos condensados", dotadas de potentes propiedades antioxidantes.

Probióticos: es un adjetivo que se aplica a ciertos microorganismos presentes en la flora intestinal.

Scoby: Combinación de bacterias y levaduras, conocida como cultivo simbiótico de bacterias y levaduras

Temperatura: es una magnitud referida a la noción de calor medible mediante un termómetro.

16 REFERENCIAS

Acharya, S., & Nummer, B. A. (2022). Evaluating Kombucha and Fruit Juice Blends for a 5-Log Reduction of Acid-Adapted *Escherichia coli* O157. *Food and Nutrition Sciences*, 13(7), Article 7. <https://doi.org/10.4236/fns.2022.137047>

Aguilera Garca, C. M., Barberá Mateos, J. M., Esperanza Días, L., & Duarte de Patro, A. (2017). *Alimentos funcionales, aproximación a una nueva alimentación*. Subdirección General de Alimentación. <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM009703.pdf>

Aloulou, A., Hamden, K., Elloumi, D., Ali, M. B., Hargafi, K., Jaouadi, B., Ayadi, F., Elfeki, A., & Ammar, E. (2012). Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 63. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-63>

Álvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm*, 22(10), 130-140.

Álvarez Cilleros, D. (2020). *MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FLAVANOLES DEL CACAO EN RIÑÓN Y ENDOTELIO DURANTE LA DIABETES. ESTUDIO EN CULTIVOS CELULARES Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN* [Doctoral, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/63790/1/T42048.pdf>

Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jegou, G., Garrido, C., & Guzzo, J. (2016). Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*, 53, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.009>

Ballester Espigares, I. M. (2006). *Relación estructura-actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios intestinales*. <https://digibug.ugr.es/handle/10481/1079>

Banerjee, D., Hassarajani, S. A., Maity, B., Narayan, G., Bandyopadhyay, S. K., & Chattopadhyay, S. (2010). Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: Possible mechanism of action. *Food & Function*, 1(3), 284. <https://doi.org/10.1039/c0fo00025f>

Benalcazar Bassante, J. C. (2018). *Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica*. [universidad San Francisco de Quito USFQ,]. <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/8423/1/139537.pdf>

Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., Quintero-Gutiérrez, A. G., Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>

Bielik, V., & Kolisek, M. (2021). Bioaccessibility and Bioavailability of Minerals in Relation to a Healthy Gut Microbiome. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), Article 13. <https://doi.org/10.3390/ijms22136803>

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317-333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

Camandola, S., Plick, N., & Mattson, M. P. (2019). Impact of Coffee and Cacao Purine Metabolites on Neuroplasticity and Neurodegenerative Disease. *Neurochemical Research*, 44(1), 214-227. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2492-0>

Carbajal Azcona, Á. (2017). Manual de Nutrición y Dietética- Minerales. *Universidad Complutense de Madrid*. <https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2017-12-02-cap-10-minerales-2017.pdf>

Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. • *International Journal of Food Microbiology*, 220, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015>

Claudia Alexandra, T. Y. (2015). "APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES, CASCARILLA DE CACAO (*Theobroma cacao* L.) VARIEDAD ARRIBA Y CCN51 PARA LA ELABORACIÓN DE UNA INFUSIÓN". <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11981/1/AL%20574.pdf>

Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., Coulloume-Labarthe, L., Fall, A., Daube, G., & Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix048>

Council, N. R., Studies, D. on E. and L., Sciences, C. on L., & Health, C. on D. and. (1989). *Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk*. National Academies Press.

De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. *Food Microbiology*, 73, 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008>

Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Aime, M. C. (2020). The History of Cacao and Its Diseases in the Americas. *Phytopathology*®, 110(10), 1604-1619. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW>

Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. *Nutrients*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/nu11081806>

DOF. (2018). *MODIFICACIÓN a la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados-Información comercial y sanitaria, publicada el 5 de abril*

de 2010.
https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/8150/seeco11_C/seeco11_C.html

DOF. (1978). NORMA OFICIAL MEXICANA «Determinación de pH en Alimentos» NOM-F-317-S-1978. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN.
https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4704689&fecha=23/05/1978#gsc.tab=0

DOF. (1994). NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN.
https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0

DOF. (1996). NORMA Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales.
https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4890075&fecha=26/06/1996#gsc.tab=0

Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: A review. *Food Research International*, 33(6), 409-421. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3)

FAO, & OMS. (2006). *Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación*.
<https://www.fao.org/3/a0512s/a0512s00.pdf>

Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. During fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, 46, 272-279.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018>

Galina Hidalgo, M. Á., Ortiz Rubio, M., & Guerrero Cruz, M. (2018). *Oxidative stress and antioxidants*. 47-61.

García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/52056>

Gharib, O. (2009). Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats. *Chinese medicine*, 4, 23. <https://doi.org/10.1186/1749-8546-4-23>

Guzmán Ortiz, M. A. (2021). Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal in vitro". *Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología*, 9(17), 117. <https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58159>

Hidalgo, M. Á. G., & Rubio, M. O. (2018). *Estrés oxidativo y antioxidantes*. issn 0188789-0.

Hii, C., Law, C., Suzannah, S., Mishawi, & Cloke, M. (2009). Polyphenols in cocoa (Theobroma cacao L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. [https://www.semanticscholar.org/paper/Polyphenols-in-cocoa-\(Theobroma-cacao-L.\)-Hii-Law/742c5f7da83ccf543b94d5ec7f6d61ce98cc03b0](https://www.semanticscholar.org/paper/Polyphenols-in-cocoa-(Theobroma-cacao-L.)-Hii-Law/742c5f7da83ccf543b94d5ec7f6d61ce98cc03b0)

Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Quantitative Analysis of Reducing Sugars by 3, 5-Dinitrosalicylic Acid (DNSA Method). En A. Jain, R. Jain, & S. Jain (Eds.), *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques* (pp. 181-183). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43

Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., & Yun, S.-E. (2010). Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 843.

Jokić, S., Gagić, T., Knez, Ž., Šubarić, D., & Škerget, M. (2018). Separation of Active Compounds from Food by-Product (Cocoa Shell) Using Subcritical Water Extraction. *Molecules*, 23(6), 1408. <https://doi.org/10.3390/molecules23061408>

Jones, J. A., Vernacchio, V. R., Collins, S. M., Shirke, A. N., Xiu, Y., Englaender, J. A., Cress, B. F., McCutcheon, C. C., Linhardt, R. J., & Gross, R. A. (2017). *Complete biosynthesis of anthocyanins using E. coli polycultures*. *mBio* 8: E00621-17.

Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>

López López, P. C. (2013). *Elaboración de Compost a partir de Cascarilla de Cacao* [bachelorThesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2562>

Malbaša, R., Lončar, E., & Djurić, M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. *Food Chemistry*, 106(3), 1039-1045. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020>

Martínez de Victoria, E. (2016). El calcio, esencial para la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 33, 26-31. <https://doi.org/10.20960/nh.341>

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. hosp*, 271-278.

Morshedi, A., Dashti, M. H., Rafati, A., A.A.S, S., & Mosaddegh, M. (2006). The chronic effect of Kombucha Tea consumption on weight loss in diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants*. <https://www.semanticscholar.org/paper/The-chronic-effect-of-Kombucha-Tea-consumption-on-Morshedi-Dashti/0ed239078b7cbc5908ec733d4bf838c2519128cd>

ODS. (2015). *Objetivos de Desarrollo Sostenible | Programa De Las Naciones Unidas Para El Desarrollo*. UNDP. <https://www.undp.org/es/sustainable-development-goals>

OPS/OMS. (2016). *OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/temas/micronutrientes>

Perea-Villamil, J. A., Cadena-Cala, T., & Herrera-Ardila, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(2), 128-134.

Pessione, E., Mazzoli, R., Giuffrida, M. G., Lamberti, C., Garcia-Moruno, E., Barelllo, C., Conti, A., & Giunta, C. (2005). A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. *PROTEOMICS*, 5(3), 687-698. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401116>

Pluriti, G., Zócchi, M., Della Porta, M., & Ficara, V. (2021). *Magnesio en la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2*. <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/2/320>

Prasad, D., B., Y., A.K., K., Pauline, T., Bansal, A., & Sairam, M. (2003). Dipti P., Yogesh B., Kain A.K., Pauline T., Anju B., Sairam M., et al (2003). Lead induced oxidative stress: Beneficial effects of Kombucha tea. *Biomed Environ Sci*. 16: 276-282. *Biomedical and Environmental Sciences*, 16, 276-282.

Ramírez-Aristizabal, L. S., Ortíz, A., Restrepo-Aristizabal, M. F., & Salinas-Villada, J. F. (2017). ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN TÉ VERDE POR EXTRACCIÓN A DIFERENTES TEMPERATURAS DE CUATRO MARCAS VENDIDAS EN COLOMBIA. *Vitae*, 24(2), 132-145. <https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2a06>

Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>

Salem, A., & Guillermo, T. (2013). *Aprovechamiento de subproductos de Cacao CCN-51 para elaboración de bebida alcohólica a partir de exudado de mucilago con adición de cascarillas irradiadas con UV-C* [bachelorThesis, UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL. FACULTAD: CIENCIAS DE LA INGENIERÍA]. <http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/handle/123456789/5025>

Sangrois, E., José Soto, M., & Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones. *Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 64(2). <https://www.alanrevista.org/ediciones/2014/2/art-7/>

Soliz Rivero, G., Mestanza Rosero, M. G., Pinos Tigrero, J. I., Andrade Rada, J. V., Soliz Rivero, G., Mestanza Rosero, M. G., Pinos Tigrero, J. I., & Andrade Rada, J. V. (2021). Trastornos del Sodio. *Revista Virtual de la Sociedad Paraguaya de Medicina Interna*, 8(1), 156-166. <https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2021.08.01.156>

Suraci, N., Baruqui, D. L., Santana, A., & Garcia, J. P. (2018). The Cardiovascular effects of chocolate. *Reviews in Cardiovascular Medicine*, 19(4), Article 4. <https://doi.org/10.31083/j.rcm.2018.04.3187>

Teneda Llerena, W., Guaman-Guevara, D., & Oyaque, S. (2019). Exploración de la intención de consumo de la Cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) como infusión: Caso Tungurahua-Ecuador. *Cuadernos de Contabilidad*, 20, 1-14. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.cc20-50.eicc>

Valenzuela B, A. (2007). CHOCOLATE, A HEALTHY PLEASURE. *Revista chilena de nutrición*, 34(3), 180-190. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182007000300001>

Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, I., Adriano-Anaya, L., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3), 239-254.

Vīna, I., Semjonovs, P., Linde, R., & Deniņa, I. (2014). Current Evidence on Physiological Activity and Expected Health Effects of Kombucha Fermented Beverage. *Journal of Medicinal Food*, 17(2), 179-188. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0031>

Wang, Z., & Zhao, Z. (2005). Extraction of anthocyanin from *Malva sylvestris* by microbial degradation and its molecular modification. *SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY*, 6, 62-65.

Weiss, G. A., & Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(16), 2959-2977. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x>

Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5)

Yana Yanqui, G., Cayo Yampara, G. S., & Charrez Mamani, A. C. (2019). *DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES*. <https://es.scribd.com/document/438124467/AZUCARES-REDUCTORES-1#:~:text=Espec%C3%ADficamente%2C%20un%20az%C3%BAcar%20reductor%20es,el%20sabor%20de%20la%20comida.>

Yann, D., & Pauline, G. (2014). Usefulness of Natural Starters in Food Industry: The Example of Cheeses and Bread. *Food and Nutrition Sciences*, 05, 1679-1691. <https://doi.org/10.4236/fns.2014.517181>

Vázquez-Cabral, B. D., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., González-Herrera, S. M., González-Laredo, R. F., Moreno-Jiménez, M. R., & Córdova-Moreno, I. T. (2014). Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (*Quercus resinosa*) inoculated with the kombucha consortium under different processing conditions. *Nutrafoods*, 13(4), 169-178.

Alojamiento de la tesis en el repositorio institucional	
Título de la Tesis:	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE INFUSIÓN FERMENTADA DE CASCARILLA DE CACAO.
Autor (a) o autores(ras) de la tesis:	Alondra Velázquez Méndez. Gaby Mariel vivas García.
ORCID:	https://orcid.org/0009-0005-5863-3323 https://orcid.org/0009-0006-7277-3397
Resumen de la Tesis:	El cacao se cultiva en muchos países siendo el Estado de Tabasco uno de los principales productores nacionales, se le atribuyen efectos benéficos para la salud además de poseer un agradable sabor. La importancia fitoquímica del cacao son los flavonoides, los cuales ejercen efectos antioxidantes y desinflamatorios al consumirlo, dichos flavonoides están presentes en hojas, semillas y cascaras de semillas, etc. Para muchos, la parte aprovechable es la semilla y terminan por desechar la cascarilla, siendo este un desecho agroindustrial, sin embargo, recientemente se han descrito las propiedades que podría ofrecer Teobroma cacao L. en materias primas no utilizadas, Investigaciones recientes han ratificado que la ingesta de la infusión de cascarilla aporta antioxidantes, previene enfermedades cardiovasculares y cancerígenas. Cabe señalar que la producción de alimentos fermentados mejora las características nutricionales y brinda efectos en la salud. La fermentación de los alimentos se ha realizado de forma natural o con el empleo de cultivos iniciadores como es el caso de la kombucha, la cual se produce a través de la fermentación aeróbica de té negro y azúcar mediante una combinación de un consorcio microbiano, conocida como cultivo simbiótico de bacterias y levaduras (SCOBY).

	Se elaboró una bebida a partir de la cascarilla de cacao empleada como infusión a través del proceso de fermentación, en la cual se vio una mejora en los efectos sin embargo se deben seguir evaluando sus efectos biológicos.
Palabras claves de la tesis:	Cacao, Cascarilla, Kombucha, Fermentación.
Referencias citadas:	Acharya, S., & Nummer, B. A. (2022). Evaluating Kombucha and Fruit Juice Blends for a 5-Log Reduction of Acid-Adapted <i>Escherichia coli</i> O157. Food and Nutrition Sciences, 13(7), Article 7. https://doi.org/10.4236/fns.2022.137047 Aguilera Garca, C. M., Barberá Mateos, J. M., Esperanza Días, L., & Duarte de Patro, A. (2017). Alimentos funcionales, aproximación a una nueva alimentación. Subdirección General de Alimentación. http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM009703.pdf Aloulou, A., Hamden, K., Elloumi, D., Ali, M. B., Hargafi, K., Jaouadi, B., Ayadi, F., Elfeki, A., & Ammar, E. (2012). Hypoglycemic and antilipidemic properties of kombucha tea in alloxan-induced diabetic rats. BMC Complementary and Alternative Medicine, 12, 63. https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-63 Álvarez Castro, E., & Orallo Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. Offarm, 22(10), 130-140.

Álvarez Cilleros, D. (2020). MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FLAVANOLES DEL CACAO EN RIÑÓN Y ENDOTELIO DURANTE LA DIABETES. ESTUDIO EN CULTIVOS

CELULARES Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN [Doctoral, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID].

<https://eprints.ucm.es/id/eprint/63790/1/T42048.pdf>

Aoudia, N., Rieu, A., Briandet, R., Deschamps, J., Chluba, J., Jegu, G., Garrido, C., & Guzzo, J. (2016). Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiology*, 53, 51-59.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.009>

Ballester Espigares, I. M. (2006). Relación estructura-actividad de los flavonoides como agentes antiinflamatorios intestinales.

<https://digibug.ugr.es/handle/10481/1079>

Banerjee, D., Hassarajani, S. A., Maity, B., Narayan, G., Bandyopadhyay, S. K., & Chattopadhyay, S. (2010). Comparative healing property of kombucha tea and black tea against indomethacin-induced gastric ulceration in mice: Possible mechanism of action. *Food & Function*, 1(3), 284.

<https://doi.org/10.1039/c0fo00025f>

Benalcazar Bassante, J. C. (2018). Evaluación de diferentes pretratamientos químicos a la biomasa de la cáscara de cacao para procesos de fermentación alcohólica. [Universidad San Francisco de Quito USFQ,].

<https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/8423/1/139537.pdf>

Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., AlcántarRodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., Quintero-Gutiérrez,

A. G., Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., PugaDíaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP).

TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 23.
<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>

Bielik, V., & Kolisek, M. (2021). Bioaccessibility and Bioavailability of Minerals in Relation to a Healthy Gut Microbiome. International Journal of Molecular Sciences, 22(13), Article 13.
<https://doi.org/10.3390/ijms22136803>

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. Nutrition Reviews, 56(11), 317-333. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>

Camandola, S., Plick, N., & Mattson, M. P. (2019). Impact of Coffee and Cacao Purine Metabolites on Neuroplasticity and Neurodegenerative Disease. Neurochemical Research, 44(1), 214-227. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2492-0>

Carbajal Azcona, Á. (2017). Manual de Nutrición y Dietética-Minerales. Universidad Complutense de Madrid.

	https://www.ucm.es/data/cont/docs/458-2017-12-02-cap10-minerales-2017.pdf Chakravorty, S., Bhattacharya, S., Chatzinotas, A., Chakraborty, W., Bhattacharya, D., & Gachhui, R. (2016). Kombucha tea fermentation: Microbial and biochemical dynamics. <i>International Journal of Food Microbiology</i>, 220, 63-72. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.12.015 Claudia Alexandra, T. Y. (2015). "APROVECHAMIENTO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES, CASCARILLA DE CACAO (Theobroma cacao L.) VARIEDAD ARRIBA Y CCN51 PARA LA ELABORACIÓN DE UNA INFUSIÓN". https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11981/1/AL%20574.pdf Coton, M., Pawtowski, A., Taminiau, B., Burgaud, G., Deniel, F., CoulloumeLabarthe, L., Fall, A., Daube, G., & Coton, E. (2017). Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. <i>FEMS Microbiology Ecology</i>, 93(5). https://doi.org/10.1093/femsec/fix048 Council, N. R., Studies, D. on E. and L., Sciences, C. on L., & Health, C. on D. and. (1989). <i>Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk</i>. National Academies Press. De Filippis, F., Troise, A. D., Vitaglione, P., & Ercolini, D. (2018). Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha
--	--

	tea fermentation. Food Microbiology, 73, 11-16. https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.008 Díaz-Valderrama, J. R., Leiva-Espinoza, S. T., & Aime, M. C. (2020). The History of Cacao and Its Diseases in the Americas. Phytopathology®, 110(10), 1604-1619. https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-20-0178-RVW Dimidi, E., Cox, S. R., Rossi, M., & Whelan, K. (2019). Fermented Foods: Definitions and Characteristics, Impact on the Gut Microbiota and Effects on Gastrointestinal Health and Disease. Nutrients, 11(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/nu11081806 DOF. (2018). MODIFICACIÓN a la Norma Oficial Mexicana NOM-051-SCFI/SSA1- 2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria, publicada el 5 de abril de 2010. https://www.dof.gob.mx/normasOficiales/8150/seeco11_C/seeco11_C.html DOF. (1978). NORMA OFICIAL MEXICANA «Determinación de pH en Alimentos» NOM-F-317-S-1978. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4704689&fecha=23/05/1978#gsc.tab=0 DOF. (1994). NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0
--	--

	DOF. (1996). NORMA Oficial Mexicana NOM-086-SSA1-1994, Bienes y servicios. Alimentos y bebidas no alcohólicas con modificaciones en su composición. Especificaciones nutrimentales. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4890075&fecha=26/06/1996#gsc.tab=0 Dufresne, C., & Farnworth, E. (2000). Tea, Kombucha, and health: A review. <i>Food Research International</i>, 33(6), 409-421. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00067-3 FAO, & OMS. (2006). Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación. https://www.fao.org/3/a0512s/a0512s00.pdf Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by <i>Lactobacillus</i> spp. During fermentation of cherry juice and broccoli puree. <i>Food Microbiology</i>, 46, 272-279. https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.018 Galina Hidalgo, M. Á., Ortiz Rubio, M., & Guerrero Cruz, M. (2018). Oxidative stress and antioxidants. 47-61 García Martínez, E. M., Fernández Segovia, I., & Fuentes López, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. https://riunet.upv.es/handle/10251/52056 Gharib, O. (2009). Effects of Kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats. <i>Chinese medicine</i>, 4, 23. https://doi.org/10.1186/1749-8546-4-23
--	---

Guzmán Ortiz, M. A. (2021). Resistencia de microorganismos aislados de kombucha a condiciones del tracto gastrointestinal in vitro". Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología, 9(17), 117.

<https://doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2016.17.58159>

Hidalgo, M. Á. G., & Rubio, M. O. (2018). Estrés oxidativo y antioxidantes. issn 0188789-0.

Hii, C., Law, C., Suzannah, S., Misnawi, & Cloke, M. (2009). Polyphenols in cocoa (Theobroma cacao L.). Asian Journal of Food and Agro-Industry.

[https://www.semanticscholar.org/paper/Polyphenols-in-cocoa-\(Theobroma-cacaoL.\)-Hii-](https://www.semanticscholar.org/paper/Polyphenols-in-cocoa-(Theobroma-cacaoL.)-Hii-Law/742c5f7da83ccf543b94d5ec7f6d61ce98cc03b0)

[Law/742c5f7da83ccf543b94d5ec7f6d61ce98cc03b0](https://www.semanticscholar.org/paper/Polyphenols-in-cocoa-(Theobroma-cacaoL.)-Hii-Law/742c5f7da83ccf543b94d5ec7f6d61ce98cc03b0)

Jain, A., Jain, R., & Jain, S. (2020). Quantitative Analysis of Reducing Sugars by 3, 5-Dinitrosalicylic Acid (DNSA Method). En A. Jain, R. Jain, & S. Jain (Eds.), Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques (pp. 181-183). Springer US.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9861-6_43

Jayabalan, R., Malini, K., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., & Yun, S.-E. (2010). Biochemical characteristics of tea fungus produced during kombucha fermentation. Food Science and Biotechnology, 19(3), 843.

Jokić, S., Gagić, T., Knez, Ž., Šubarić, D., & Škerget, M. (2018). Separation of Active Compounds from Food by-Product (Cocoa

	Shell) Using Subcritical Water Extraction. <i>Molecules</i>, 23(6), 1408. https://doi.org/10.3390/molecules23061408 Jones, J. A., Vernacchio, V. R., Collins, S. M., Shirke, A. N., Xiu, Y., Englaender, J. A., Cress, B. F., McCutcheon, C. C., Linhardt, R. J., & Gross, R. A. (2017). Complete biosynthesis of anthocyanins using <i>E. coli</i> polycultures. <i>mBio</i> 8: E00621-17. Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. <i>Journal of Food Science and Technology</i>, 48(4), 412-422. https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1 López López, P. C. (2013). Elaboración de Compost a partir de Cascarilla de Cacao [bachelor Thesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/2562 Malbaša, R., Lončar, E., & Djurić, M. (2008). Comparison of the products of Kombucha fermentation on sucrose and molasses. <i>Food Chemistry</i>, 106(3), 1039- 1045. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.07.020 Martínez de Victoria, E. (2016). El calcio, esencial para la salud. <i>Nutrición Hospitalaria</i>, 33, 26-31. https://doi.org/10.20960/nh.341 Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. <i>Nutr. hosp</i>, 271-278.
--	---

	Morshedi, A., Dashti, M. H., Rafati, A., A.A.S, S., & Mosaddegh, M. (2006). The chronic effect of Kombucha Tea consumption on weight loss in diabetic rats. Journal of Medicinal Plants. https://www.semanticscholar.org/paper/The-chronic-effect-ofKombucha-Tea-consumption-on-MorshediDashti/0ed239078b7cbc5908ec733d4bf838c2519128cd ODS. (2015). Objetivos de Desarrollo Sostenible Programa De Las Naciones Unidas Para El Desarrollo. UNDP. https://www.undp.org/es/sustainabledevelopment-goals OPS/OMS. (2016). OPS/OMS Organización Panamericana de la Salud. https://www.paho.org/es/temas/micronutrientes Perea-Villamil, J. A., Cadena-Cala, T., & Herrera-Ardila, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud, 41(2), 128-134. Pessione, E., Mazzoli, R., Giuffrida, M. G., Lamberti, C., Garcia-Moruno, E., Barello, C., Conti, A., & Giunta, C. (2005). A proteomic approach to studying biogenic amine producing lactic acid bacteria. PROTEOMICS, 5(3), 687-698. https://doi.org/10.1002/pmic.200401116 Pluriti, G., Zócchi, M., Della Porta, M., & Ficara, V. (2021). Magnesio en la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes tipo 2. https://www.mdpi.com/2072-6643/13/2/320
--	--

	Prasad, D., B., Y., A.K., K., Pauline, T., Bansal, A., & Sairam, M. (2003). Dipti P., Yogesh B., Kain A.K., Pauline T., Anju B., Sairam M., et al (2003). Lead induced oxidative stress: Beneficial effects of Kombucha tea. Biomed Environ Sci. 16: 276- 282. Biomedical and Environmental Sciences, 16, 276-282. Ramírez-Aristizabal, L. S., Ortiz, A., Restrepo-Aristizabal, M. F., & Salinas-Villada, J. F. (2017). ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN TÉ VERDE POR EXTRACCIÓN A DIFERENTES TEMPERATURAS DE CUATRO MARCAS VENDIDAS EN COLOMBIA. Vitae, 24(2), 132-145. https://doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n2a06 Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. Frontiers in Microbiology, 9, 1785. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785 Salem, A., & Guillermo, T. (2013). Aprovechamiento de subproductos de Cacao CCN-51 para elaboración de bebida alcohólica a partir de exudado de mucilago con adición de cascarillas irradiadas con UV-C [bachelorThesis, UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL. FACULTAD: CIENCIAS DE LA INGENIERÍA]. http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/handle/123456789/5025 Sangrois, E., José Soto, M., & Buscema, I. (2014). Cascarilla de cacao venezolano como materia prima de infusiones. <i>Revista de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición</i>, 64(2). https://www.alanrevista.org/ediciones/2014/2/art-7/ Soliz Rivero, G., Mestanza Rosero, M. G., Pinos Tigrero, J. I., Andrade Rada, J. V., Soliz Rivero, G., Mestanza Rosero, M. G., Pinos Tigrero, J. I., & Andrade Rada, J. V. (2021). Trastornos del
--	--

	Sodio. <i>Revista Virtual de la Sociedad Paraguaya de Medicina Interna</i>, 8(1), 156-166. https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2021.08.01.156 Suraci, N., Baruqui, D. L., Santana, A., & Garcia, J. P. (2018). The Cardiovascular effects of chocolate. <i>Reviews in Cardiovascular Medicine</i>, 19(4), Article 4. https://doi.org/10.31083/j.rcm.2018.04.3187 Teneda Llerena, W., Guaman-Guevara, D., & Oyaque, S. (2019). Exploración de la intención de consumo de la Cascarilla de cacao (Theobroma cacao L.) como infusión: Caso Tungurahua-Ecuador. <i>Cuadernos de Contabilidad</i>, 20, 1-14. https://doi.org/10.11144/Javeriana.cc20-50.eicc Valenzuela B, A. (2007). CHOCOLATE, A HEALTHY PLEASURE. <i>Revista chilena de nutrición</i>, 34(3), 180-190. https://doi.org/10.4067/S0717-75182007000300001 Vázquez-Ovando, A., Ovando-Medina, J., Adriano-Anaya, L., Betancur-Ancona, D., & Salvador-Figueroa, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. <i>Archivos Latinoamericanos de Nutrición</i>, 66(3), 239-254. Vina, I., Semjonovs, P., Linde, R., & Deniņa, I. (2014). Current Evidence on Physiological Activity and Expected Health Effects of Kombucha Fermented Beverage. <i>Journal of Medicinal Food</i>, 17(2), 179-188. https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0031
--	--

	Wang, Z., & Zhao, Z. (2005). Extraction of anthocyanin from <i>Malva sylvestris</i> by microbial degradation and its molecular modification. <i>SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY</i>, 6, 62-65. Weiss, G. A., & Hennet, T. (2017). Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. <i>Cellular and Molecular Life Sciences</i>, 74(16), 2959-2977. https://doi.org/10.1007/s00018-017-2509-x Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in <i>Theobroma cacao</i>: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. <i>Food Research International</i>, 33(6), 423-447. https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00068-5 Yana Yanqui, G., Cayo Yampara, G. S., & Charrez Mamani, A. C. (2019). <i>DETERMINACION DE AZUCARES REDUCTORES</i>. https://es.scribd.com/document/438124467/AZUCARES-REDUCTORES1#:~:text=Espec%C3%ADficamente%2C%20un%20az%C3%BAcar%20reductor%20es,el%20sabor%20de%20la%20comida. Yann, D., & Pauline, G. (2014). Usefulness of Natural Starters in Food Industry: The Example of Cheeses and Bread. <i>Food and Nutrition Sciences</i>, 05, 1679-1691. https://doi.org/10.4236/fns.2014.517181 Vázquez-Cabral, B. D., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., GonzálezHerrera, S. M., González-Laredo, R. F., Moreno-Jiménez, M. R., & Córdova-Moreno, I. T. (2014). Chemical and sensory evaluation of a functional beverage obtained from infusions of oak leaves (<i>Quercus resinosa</i>) inoculated with the kombucha.
--	--

	consortium under different processing conditions. Nutrafoods, 13(4), 169-178.
--	--