

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**



“TESIS”

**Efecto del tiempo y temperatura de extracción de azúcares
fermentables en el contenido de metanol de la bebida fermentada
de semillas de molle (*Schinus molle* L.)**

PRESENTADO POR:

Bach. Nataly Danitza Chavez Nuñez

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ASESORADO POR:

Ing. Jesús Javier Paniagua Segovia

AYACUCHO- PERU

2023

DEDICATORIA

A mis padres Cayo y Alicia por su inmenso amor, por el esfuerzo de brindarme siempre lo mejor y por hacer de mí una persona con valores y principios.

A mi hermana Mónica por su compañía y apoyo en el transcurso de mi desarrollo personal y profesional.

A ellos porque son lo más valioso que Dios me dio.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis sinceros agradecimientos a:

Dios por darme salud y fuerzas en todo momento.

A mis añorados padres y a mi hermana que han estado al tanto de mí en todo momento, por ser mi soporte día a día, por la motivación y todo el amor que siempre me dan.

Al Ing. Jesús Javier Paniagua Segovia por su apoyo constante de contribuir con sus conocimientos e ideas en el desarrollo de la presente investigación, por el tiempo dedicado y por la confianza brindada hacia mi persona.

A los jurados de tesis, al Dr. Alfredo Arias Jara, al Dr. Fidel Mujica Lengua, al Mg. Julio Pablo Godenzi Vargas, por el interés, apoyo y por las sugerencias para concluir el presente trabajo.

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, al personal administrativo y a la plana de docentes de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia por las enseñanzas impartidas durante mi formación profesional.

RESUMEN

Las bebidas alcohólicas que se obtienen de diversas semillas y frutos contienen etanol, metanol y otros alcoholes superiores que no son determinados regularmente, y pueden ser tóxicos por la presencia de metanol. En la región andina del Perú y en particular en la región Ayacucho se elabora una bebida fermentada (chicha de molle) a partir de semillas de molle, esta bebida se elabora desde los pre incas hasta la actualidad y no se controla las características fisicoquímicas y toxicológicas de la bebida.

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la presencia de metanol en la bebida fermentada a partir de extractos azucarados (mostos) de semillas de molle (*Schinus molle L.*). Las semillas fueron recolectadas del centro poblado de Santa Bárbara del distrito de Tambillo, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Se realizó la extracción de los azúcares fermentables de las semillas de molle mediante un diseño factorial de dos factores (temperatura y tiempo de extracción) con tres niveles de experimentación (20 °C, 55 °C, 90 °C) y (15 min, 30 min, 45 min) los mostos obtenidos tuvieron un promedio de °Brix ($8,40 \pm 0,20$), densidad ($1,0310 \pm 0,0008$ g/ml), el porcentaje de pectina extraído en los mostos con tratamientos a 20 °C, 50 °C, 90 °C fue de $0,812 \pm 0,065$ %, $0,988 \pm 0,088$ % y $1,154 \pm 0,114$ % respectivamente. La fermentación alcohólica se realizó con los siguientes parámetros pH ($4,13 \pm 0,05$), acidez total ($0,226 \pm 0,028$ % exp. Ac. Tartárico) y temperatura de fermentación ($23,41 \pm 0,27$ °C). La determinación de metanol se realizó por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) mediante la regresión de mínimos cuadrados PLS con el software TQ Analyst y se obtuvo concentraciones de metanol entre 7,31 a 39,00 mg/100 ml de muestra. Se demostró mediante el análisis de varianza con un nivel de confianza de 95% que la temperatura y el tiempo de extracción de los azúcares fermentables influyen significativamente en la concentración de metanol de la bebida fermentada. Las bebidas fermentadas con mayor concentración de metanol ($36,96 \pm 2,60$ mg/100 ml) se obtuvieron con los mostos extraídos a 55 °C. Respecto a las características, tuvieron un promedio de pH ($3,34 \pm 0,06$), acidez total ($0,5826 \pm 0,0381$ % exp. Ac. Tartárico), densidad ($0,998 \pm 0,001$ g/ml), grados alcohólicos ($2,98 \pm 0,04$ %) y acidez volátil ($0,0204 \pm 0,0091$ % exp. Ac. Acético). La bebida fermentada de semillas de molle con mejores características fisicoquímicas y menor toxicidad (pH $3,24 \pm 0,06$, acidez total $0,614 \pm 0,026$ exp. Ac. Tartárico, acidez volátil $0,012 \pm 0,002$ exp. Ac. Acético y metanol $14,34 \pm 0,29$ mg /100 ml) es aquella que se obtuvo a partir de los extractos azucarados obtenidos a 90°C y 15 minutos.

Palabras clave. Semillas de molle, bebida fermentada, metanol, espectroscopía FT-IR

ABSTRACT

Alcoholic beverages obtained from various seeds and fruits contain ethanol, methanol, and other higher alcohols that are not regularly determined, and can be toxic due to the presence of methanol. In the Andean region of Peru and particularly in the Ayacucho region, a fermented drink (chicha de molle) is made from molle seeds. This drink is made from the pre-Incas to the present day and its physicochemical and toxicological characteristics are not controlled. of the drink

The objective of this research work was to evaluate the presence of methanol in the fermented beverage from sugar extracts (musts) of molle seeds (*Schinus molle* L.). The seeds were collected from the populated center of Santa Bárbara in the district of Tambillo, province of Huamanga, department of Ayacucho. Extraction of fermentable sugars from molle seeds was carried out using a factorial design of two factors (temperature and extraction time) with three levels of experimentation (20 °C, 50 °C, 90 °C) and (15 min, 30 min, 45 min) the obtained musts had an average of °Brix (8.40 ± 0.20), density (1.0310 ± 0.0008 g/ml), the percentage of pectin extracted in the musts with treatments at 20°C, 50°C, 90°C were $0.812 \pm 0.065\%$, $0.988 \pm 0.088\%$ and $1.154 \pm 0.114\%$ respectively. The alcoholic fermentation was carried out with the following parameters: pH (4.13 ± 0.05), total acidity (0.226 ± 0.028 % exp. Tartaric Ac.) and fermentation temperature (23.41 ± 0.27). The determination of methanol was carried out by FTIR-ATR spectrometry using PLS least square regression with the TQ Analyst software, and methanol concentrations between 7.31 and 39.00 mg/100 ml of sample were obtained. It was demonstrated through the analysis of variance with a confidence level of 95% that the temperature and the extraction time of the fermentable sugars significantly influence the methanol concentration of the fermented beverage. The fermented beverages with the highest methanol concentration (36.96 ± 2.60 mg/100 ml) were obtained with the musts extracted at 55 °C.

The fermented drink of molle seeds with the best physicochemical and toxicological characteristics (pH 3.24 ± 0.06 , total acidity 0.614 ± 0.026 exp. Tartaric Ac., volatile acidity 0.012 ± 0.002 exp. Acetic Acid and methanol 14.34 ± 0.29 mg /100 ml) is that which was obtained from the sugar extracts obtained at 90°C and 15 minutes.

Keywords. Molle seeds, fermented beverage, methanol, spectroscopy FT- IR

ÍNDICE

CAPÍTULO I	1
GENERALIDADES	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.2.1 Problema principal.....	2
1.2.2 Problema secundario.....	2
1.3 OBJETIVOS	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	3
1.4.1 Justificación ambiental.....	3
1.4.2 Justificación económica.....	4
1.4.3 Justificación social.....	4
1.5 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	4
1.5.1 Espacial.....	4
1.5.2 Temporal	4
1.6 HIPÓTESIS	4
1.6.1 Hipótesis general.....	4
1.6.2 Hipótesis específica	4
1.7 VARIABLES	5
1.7.1 Variables dependientes	5
1.7.2 Variable independiente	5
CAPÍTULO II	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1 ANTECEDENTES	6
2.2 EL MOLLE	7
2.2.1 Clasificación botánica.....	8
2.3 SEMILLAS DE MOLLE	8
2.3.1 Época de cosecha de semillas de molle	9
2.3.2 Composición química de las semillas de molle	9
2.3.3 Aceite esencial de frutos de molle	10
2.3.4 Azúcares de las semillas de molle	11
Extracción de azúcares de semillas de molle.....	11

2.3.5	Usos y propiedades de las semillas de molle.....	12
2.4	PECTINAS	13
2.4.1	Extracción de pectina	13
2.5	CHICHA DE SEMILLAS DE MOLLE	13
2.5.1	Elaboración de la chicha de molle	14
2.5.2	Propiedades fisicoquímicas de la chicha de molle	14
2.6	FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	15
2.6.1	Factores que afectan al proceso de fermentación	16
2.6.1.1	Control de temperatura	16
2.6.1.2	Control de pH.....	17
2.6.1.3	Aireación.....	17
2.6.1.4	Enzimas.....	17
2.6.1.5	Concentración de azúcares.....	18
2.6.2	Parámetros a controlar en el proceso fermentativo.....	18
2.6.2.1	Grados brix	18
2.6.2.2	Acidez.....	18
2.6.2.3	Grado alcohólico	19
2.6.3	Componentes de las bebidas alcohólicas	19
2.7	METANOL.....	19
2.7.1	Origen del metanol	20
2.7.2	Concentración de metanol en bebidas alcohólicas	20
2.7.3	Límites de metanol permitidos en las bebidas alcohólicas	21
2.7.4	Toxicidad del metanol.....	22
2.7.5	Factores que influyen en la generación de metanol	23
2.7.6	Determinación de metanol por Espectroscopia FTIR	24
CAPÍTULO III.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1	LUGAR DE EJECUCIÓN DEL TRABAJO	26
3.2	PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO	26
3.2.1	Nivel de investigación	26
3.2.2	Tipo de investigación	26
3.2.3	Tipo de análisis estadístico.....	27
3.3	MATERIALES	27
3.3.1	Equipos	27
3.3.2	Materiales.....	27
3.3.3	Reactivos.....	27

3.3.4	Software	28
3.4	MÉTODOS	28
3.4.1	Tratamiento inicial de las semillas de molle	28
3.4.2	Extracción de azúcares	28
3.4.2.1	Determinación de pectina del extracto azucarado de semillas de molle	32
3.4.3	Elaboración de la bebida fermentada de semillas de molle (chicha de molle)	33
3.4.3.1	Manejo del inculo	33
3.4.3.2	Fermentación alcohólica de los extractos azucarados de semillas de molle	34
3.4.4	Caracterización fisicoquímica	35
3.4.4.1	Determinación de densidad.....	35
3.4.4.2	Determinación de °Brix	35
3.4.4.3	Determinación de pH	36
3.4.4.4	Determinación de grados alcohólicos (NTP.212.030.2019).....	37
3.4.4.5	Determinación de acidez total (NTP.211.040.2018)	38
3.4.4.6	Determinación de acidez volátil (NTP.211.040.2018)	38
3.4.4.7	Determinación de metanol por espectroscopia FT-IR.....	38
CAPÍTULO IV	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO Y ESTADÍSTICO DEL EXTRACTO AZUCARADO	41
4.1.1	Análisis de °Brix de los extractos azucarados de semillas de molles	41
4.1.2	Análisis de densidad de los extractos azucarados de semillas de molle	44
4.1.3	Análisis de pH de los extractos azucarados de semillas de molle.....	45
4.1.4	Análisis de acidez total de los extractos azucarados de semillas de molle	47
4.2 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LOS	EXTRACTOS AZUCARADOS DE SEMILLAS DE MOLLE	52
4.2.1	Evaluación de sólidos solubles (°Brix)	52
4.2.2	Control de acidez.....	53
4.2.3	Evaluación de PH	54
4.2.4	Evaluación de temperatura de fermentación.....	55
4.3 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO Y ESTADÍSTICO DE LA BEBIDA FERMENTADA	DE SEMILLAS DE MOLLE	56
4.3.1	Análisis de densidad de la bebida fermentada de semillas de molle fermentados.....	56

4.3.2	Análisis del pH de la bebida fermentada de semillas de molle.....	56
4.3.3	Análisis de acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle	60
4.3.4	Análisis de acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle	63
4.3.5	Análisis de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle.....	67
4.4	PROPUESTA DE PRODUCCIÓN DE BEBIDA FERMENTADA DE SEMILLAS DE MOLLE	73
	CONCLUSIONES	76
	RECOMENDACIONES	77
	ANEXOS.....	88

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición bioquímica del fruto de molle.....	10
Tabla 2. Composición del aceite esencial de frutos de molle	11
Tabla 3. Composición bioquímica de monosacáridos del fruto de molle.....	11
Tabla 4. Condiciones de maceración de la semilla de molle.....	12
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de dos muestras de chicha de molle.....	15
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos evaluados durante la fermentación alcohólica, para la obtención de alcohol de molle.	15
Tabla 7. Contenido de metanol en licores a partir de frutas.....	21
Tabla 8. Especificación de los límites máximos permitidos de metanol	22
Tabla 9. Factores y niveles experimentales.....	29
Tabla 10. Respuesta de los tratamientos y sus unidades de medida.....	29
Tabla 11. Tratamientos experimentales.....	30
Tabla 12. °Brix de los extractos azucarados de semillas de molle.....	41
Tabla 13. Densidad de los extractos azucarados de semillas de molle	44
Tabla 14. pH de los extractos azucarados de semillas de molle.....	45
Tabla 15. Acidez total (exp. %Ac. Tartárico) de los extractos azucarados de semillas de molle	47
Tabla 16. Porcentaje de pectina de los extractos azucarados de semillas de molle	49
Tabla 17. Temperatura de los extractos azucarados en fermentación.....	55
Tabla 18. Densidad (g/ml) a 20°C de la bebida fermentada de semillas de molle	56
Tabla 19. pH de la bebida fermentada de semillas de molle.....	57
Tabla 20. Acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle.....	60
Tabla 21. Acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle.....	63
Tabla 23. Contenido de metanol en la bebida fermentada de semillas de molle.....	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Partes del fruto de molle.....	9
Figura 2. Reacción bioquímica de la fermentación alcohólica.	16
Figura 3. Mecanismo de acción de la enzima pectinmetilesterasa	20
Figura 4. Semillas de molle ventiladas	28
Figura 5. Procedimiento de extracción de azúcares fermentables de semillas de molle	31
Figura 6. Extracción de pectina de los extractos azucarados	32
Figura 7. Diagrama de bloques del proceso de elaboración de chicha de semillas de molle	33
Figura 8. Mosto con levaduras nativas reproducidas	34
Figura 9. Fermentación alcohólica de los extractos azucarados.....	35
Figura 10. Determinación de °Brix.....	36
Figura 11. Determinación de pH.....	37
Figura 12. Lectura de grados alcohólicos de la muestra destilada.....	37
Figura 13. Lectura de espectros de los patrones y las muestras.	40
Figura 14. Comportamiento de la concentración de azúcares fermentables (°Brix) obtenidos a distintas temperaturas y tiempos de extracción	42
Figura 15. Diagrama de Pareto para °Brix de los extractos azucarados de semillas de molle	43
Figura 16. Comportamiento promedio del pH de los extractos azucarados	45
Figura 17. Diagrama de Pareto para el pH de los extractos azucarados	46
Figura 18. Comportamiento promedio de la acidez total (%Ac. Tartárico) de los extractos azucarados de semillas de molle	47
Figura 19. Diagrama de Pareto para Acidez total (exp. %Ac. Tartárico) de los extractos azucarados de semillas de molle.....	48
Figura 20. Comportamiento promedio del % pectina de los extractos azucarados	49
Figura 21. Diagrama de Pareto para el % de pectina de los extractos azucarados de semillas de molle.....	51
Figura 22. Gráfica de efectos principales para el % pectina de los extractos azucarados de semillas de molle.....	51
Figura 23. Comportamiento de los °Brix durante la fermentación de los extractos azucarados	53
Figura 24. Comportamiento de la acidez total durante la fermentación de los extractos azucarados	53

Figura 25. Comportamiento del pH durante la fermentación de los extractos azucarados obtenidos a distintas condiciones.....	54
Figura 26. Comportamiento promedio del pH de la bebida fermentada de semillas de molle	57
Figura 27. Diagrama de Pareto para pH la bebida fermentada de semillas de molle ...	58
Figura 28. Gráfica de efectos principales para pH la bebida fermentada de semillas de molle	59
Figura 29. Comportamiento promedio de la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle.....	60
Figura 30. Diagrama de Pareto para la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle.....	61
Figura 31. Gráfica de efectos principales para la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle.....	62
Figura 32. Comportamiento promedio de la acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle.....	64
Figura 33. Diagrama de Pareto para la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle.....	64
Figura 34. Gráfica de efectos principales para la acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle.....	65
Tabla 22. Grados alcohólicos de la bebida fermentada de semillas de molle	66
Figura 35. Diagrama de Pareto para el grado alcohólico de la bebida fermentada de semillas de molle.....	66
Figura 36. Espectro ampliado de la bebida fermentada de código 2015.....	67
Figura 37. Cuantificación de metanol de la bebida fermentada de código 2015	67
Figura 38. Espectro ampliado de la bebida fermentada de código 5515.....	68
Figura 39. Cuantificación de metanol de la bebida fermentada de código 5515	68
Figura 40 . Espectro ampliado de la bebida fermentada de código 9045.....	69
Figura 41. Cuantificación de metanol de la bebida fermentada de código 9045	69
Figura 42. Comportamiento promedio de metanol en las bebidas fermentadas de semillas de molle.....	70
Figura 43. Diagrama de Pareto para el contenido de metanol en las bebidas fermentada de semillas de molle.....	72
Figura 44. Gráfica de efectos principales para el contenido de metanol en las bebidas de semillas de molle.....	72
Figura 45. Diagrama de bloques del proceso de elaboración de la bebida fermentada de semillas de molle.....	75

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El origen del metanol en las bebidas fermentadas es producto de la hidrólisis enzimática de la pectina de las frutas por la pectina metilesterasa que libera los grupos metoxilo durante la fermentación alcohólica dando lugar al ácido péctico y metanol (Zhang et. al., 2011). La concentración de metanol en las bebidas está relacionada directamente con el porcentaje de pectina presente en la materia prima (Botelho et. al., 2020). Ohimain (2016) menciona que el control microbiológico podría prevenir la formación de metanol en las bebidas por ello recomienda el uso de levaduras puras.

Williams et. al., (2019) menciona que la elaboración de la bebida fermentada de semillas de molle (chicha de molle) se realiza desde las épocas pre incas y en la actualidad continúan elaborando dicha bebida en la región andina. En la región de Ayacucho la producción de esta bebida fermentada se realiza de manera artesanal en las provincias de Huamanga, Huanta, Cangallo y otros. En Huamanga, la comunidad de Santa Bárbara es uno de los principales productores conocido como la “tierra de la rica chicha de molle” así como también la comunidad de Ñeque y Guayacondo. Los consumidores de chicha de semillas de molle, manifiestan que en ocasiones al ingerir esta bebida presentan dolor de cabeza casi de manera inmediata.

En los lugares de producción de chicha de molle no está estandarizado el tiempo y temperatura de extracción de azúcares de las semillas de molle, así mismo no se toma en cuenta la hidrólisis de la pectina durante la extracción, pudiendo que estos factores sean determinantes en el contenido de metanol de la chicha de molle. En un ensayo previo de análisis de una muestra de chicha de molle proveniente Guayacondo, mediante

el método de ensayo de la NTP 211.035.2019. “Determinación de metanol y de cogeneres en bebidas alcohólicas y en alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases”, se determinó un contenido de metanol de 61.3 mg/100 ml de alcohol anhidrido (AA), dando una presunción de alto contenido de metanol si no se controlan los parámetros de extracción de azúcares y solubilización de pectina. Si bien es cierto que el contenido de metanol determinado en la chicha de molle se encuentra dentro de los límites permisibles por la NTP 212.014 .2016 “Bebidas alcohólicas vitivinícolas. Vinos. Requisitos”; las normas internacionales, son cuestionadas por Gonzáles et. al., (2020) quienes con su trabajo plantean promover la eventual discusión y revisión, ellos concluyen que los límites de metanol son establecidos por la economía de cada país por razones tecnológicas, pero no toxicológicas.

La ingesta de metanol causa toxicidad que se manifiesta con un dolor intenso de cabeza, malestar gastrointestinal y dolor relacionado con la necrosis pancreática, intranquilidad debido a que afecta el sistema nervioso, dificultad para respirar, visión borrosa pudiendo llegar a la ceguera y hasta la muerte (Arellano et. al.,2021).

Por lo tanto, para evaluar el contenido de metanol en la chicha de molle en relación al tiempo y temperatura de extracción de azúcares de semillas de molle, se plantea realizar extracciones a distintas condiciones de tiempo y temperatura de extracción; de forma que se pueda obtener un mejor tratamiento de extracción de azúcares de semillas de molle con en el que se pueda obtener una chicha de molle con bajo contenido de metanol y con buenas características fisicoquímicas.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 Problema principal

¿Cuál es la relación de las condiciones de extracción de los azúcares fermentables con el contenido de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle (*Schinus molle* L.)?

1.2.2 Problema secundario

- ¿Cuál es la relación de las condiciones de extracción de los azúcares fermentables con las características fisicoquímicas (Acidez, pH °Brix, densidad) de los extractos azucarados de semillas de molle (*Schinus molle* L.)?

- ¿Cuál es el porcentaje de pectina extraído de los extractos obtenidos a distintas condiciones de tiempo y temperatura del agua de extracción de los azúcares fermentables de semillas molle (*Schinus molle* L.)?
- ¿Cuál es el contenido de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle (*Schinus molle* L.) a partir de los extractos obtenidos?
- ¿Cuáles son las características fisicoquímicas (Acidez, pH y porcentaje de alcohol, densidad) de la bebida fermentada de semillas de molle (*Schinus molle* L.) a partir de los extractos obtenidos?

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar la relación de las condiciones de extracción de los azúcares fermentables con el contenido de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle (*Schinus molle* L.).

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar las características fisicoquímicas (pH, acidez total, densidad y °Brix) de los extractos azucarados de las semillas de molle (*Schinus molle* L.).
- Determinar el porcentaje de pectina extraído en los extractos obtenidos a distintas condiciones de tiempo y temperatura del agua de extracción de azúcares fermentables de semillas de molle (*Schinus molle* L.).
- Determinar el contenido de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle (*Schinus molle* L.) a partir de los extractos obtenidos.
- Determinar las características fisicoquímicas (acidez total, acidez volátil, pH, densidad y porcentaje de alcohol) de las bebidas fermentadas de semillas de molle (*Schinus molle* L.) obtenida a partir de los extractos azucarados.

1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

1.4.1 Justificación ambiental

Las empresas que se dedican a la producción de aceites esenciales de semillas de molle realizan un previo lavado de sus azúcares para que obtengan mayor rendimiento en la extracción de aceites, estos azúcares disueltos en el agua son materias orgánicas desperdiciadas que llegan al medio ambiente, el cual genera la multiplicación deliberada

de microorganismos que agotan el oxígeno disuelto en el agua y por consecuencia genera la destrucción del ecosistema. El aprovechamiento articulado entre productores de bebidas alcohólicas a partir de semillas de molle y productores de aceite esencial pueden reducir la contaminación ambiental que genera el desperdicio de ambas industrias.

1.4.2 Justificación económica

La obtención de una bebida alcohólica con buenas características fisicoquímicas Y toxicológicas permitiría impulsar el consumo de bebidas nacionales y reducir la importación de bebidas.

1.4.3 Justificación social

Con la tecnología adecuada durante la obtención de mostos, se puede obtener bajos niveles de metanol en la bebida fermentada de semillas de molle, de esta manera se podría salvaguardar la salud de los consumidores ante intoxicaciones por metanol.

1.5 DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

1.5.1 Espacial

La recolección de las muestras de semillas de molle se realizó en el centro poblado de Santa Bárbara, distrito de Tambillo, provincia de Huamanga y departamento de Ayacucho. La parte experimental se realizó en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

1.5.2 Temporal

La ejecución de la investigación se dio en el periodo de mayo 2022 – enero 2023

1.6 HIPÓTESIS

1.6.1 Hipótesis general

Las condiciones de extracción de azúcares fermentables se relacionan directamente con el contenido de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle (*Schinus molle* L.).

1.6.2 Hipótesis específica

- Las características fisicoquímicas (Acidez, pH, °Brix, densidad) de los extractos azucarados de semillas de molle (*Schinus molle* L.) no varían de manera significativa.

- El tiempo y la temperatura del solvente (agua) incide de manera significativa sobre el porcentaje de pectina extraído en la extracción de los azúcares fermentables de las semillas molle (*Schinus molle* L.).
- El contenido de metanol de la bebida fermentada a partir del extracto de semilla de molle (*Schinus molle* L.) en condiciones extremas de tiempo y temperatura será superior al de las bebidas fermentadas a partir de los extractos obtenidos a condiciones moderadas de temperatura y tiempo.
- Las características fisicoquímicas (acidez, pH, porcentaje de alcohol, densidad) de las bebidas fermentadas a partir de los extractos de semillas de molle (*Schinus molle* L.) no varían de manera significativa.

1.7 VARIABLES

1.7.1 Variables dependientes

- Concentración de metanol en la bebida fermentada de semillas de molle.

1.7.2 Variable independiente

- Tiempo de extracción de azúcares fermentables
- Temperatura de extracción de azucares fermentables

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

La producción de bebidas alcohólicas fermentadas se remonta a siglos en Occidente y Oriente. En América la producción de bebidas alcohólicas también se remonta a siglos atrás, las culturas prehispánicas fueron las responsables de esta producción. Williams et. al., (2019) señala que en la cultura Wari se encontró evidencias de un desarrollo amplio en la producción de bebidas alcohólicas - chicha de semillas de molle, incluso concluyen que estas bebidas fermentadas fueron de importancia social entre pueblos y permitieron la expansión y posicionamiento de la cultura Wari en distintas zonas del norte y sur del Perú.

Juárez (2011) en su trabajo denominado "Optimización de parámetros para la producción y envasado de chicha de Schinus molle", aisló e identificó cepas de levaduras presentes en la chicha de molle, optimizó los parámetros de producción y las concentraciones de los preservantes utilizados para envasarlos, estas muestras de molle fueron recolectadas de tres localidades de la provincia de Huamanga; finalmente se aislaron las cepas de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces logos*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* y cepas de *Saccharomyces sp.* La mejor cepa aislada productora de etanol resultó ser *Saccharomyces cerevisiae* que se obtuvo de la chicha del distrito de San Juan Bautista. Para la obtención de una chicha con 7.1% de etanol, la preparación del mosto se optimizó a 2 horas de maceración a una temperatura de 50°C, adicionando la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* a temperatura de 25°C por 72 horas y 15 °Brix del mosto.

Paredes et. al., (2019) en el trabajo denominado “Industrialización del fruto de molle”, realizaron un estudio de laboratorio para la industrialización del fruto de molle donde se extrajo los azúcares a 80°C por 30 min con el que se obtuvo una chicha de buen aroma, semidulce, refrescante y medicinal por su acción antidiarreica, que combate el mal del cólera, también se preparó vinagre de un aroma característico con 5,0 % de acidez 2,70 de pH; alcohol etílico al 90,4% de pureza y aceite esencial con 0,70108 de densidad y 1,4755 de índice de refracción, con buen contenido de ésteres y tocoferoles, de olor agradable semejante al mango y maracuyá.

Ohimain (2016) en su trabajo denominado “Contaminación por metanol en bebidas alcohólicas fermentadas tradicionalmente: la dimensión microbiana”, realizó una revisión donde sugiere el uso de cultivos puros para la fermentación en lugar de microorganismos mixtos que dan origen a la fermentación espontánea y describe la intervención de los microorganismos en la producción de metanol en las bebidas fermentadas tradicionalmente debido a que las bacterias, hongos y levaduras producen pectinasa que actúa sobre el mosto de frutas que poseen pectina dando como producto al metanol.

Hang y Woodams (2010) en el trabajo denominado “Influencia del cultivar de manzana y la pasteurización del jugo en el contenido de metanol de la sidra dura y el aguardiente”, estudiaron el contenido de metanol en sidras a partir de 4 variedades de manzana (Crispín, Empire, Jonagold y Pacific Rose) cultivadas en Finger de New York donde la sidra de manzana Crispín obtuvo mayor concentración de metanol (400 mg/100 ml de etanol al 40%) y con la variedad Jonagold (175 mg/100 ml de etanol al 40%); para minimizar la concentración de metanol inactivó las enzimas pécticas comerciales usadas en la extracción realizando la pasteurización y se obtuvo como resultado en la sidra de manzana Crispín una concentración de metanol de 217 mg/100 ml de etanol al 40 % y en la variedad Pacific Rose se redujo de 241 mg/100 ml a 161 mg/100 ml de etanol al 40 %.

2.2 EL MOLLE

El molle es un árbol de tronco grueso de diámetro entre 80 a 100 centímetros ello depende de la edad del árbol y aproximadamente que alcanza una altura de 7 a 15 metros, tiene hojas alargadas de 2.5 cm de largo que conforman un follaje persistente. Gallejos e Hidalgo (2009) menciona lo siguiente “Los estambres poseen una tonalidad amarillenta con una inflorescencia en panícula compuesta; su fruto es una drupa que

contiene una sola semilla (monosperma). Al madurar, el pericarpio adquiere un color rosado y se desprende produciendo frutos en abundancia”.

2.2.1 Clasificación botánica

La clasificación taxonómica de la especie *Schinus molle* L. (Molle) según el sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist (1981), ocupando las siguientes categorías.

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Orden: *Sapindales*

Familia: *Anacardiaceae*

Género: *Schinus*

Especie: *Schinus molle*

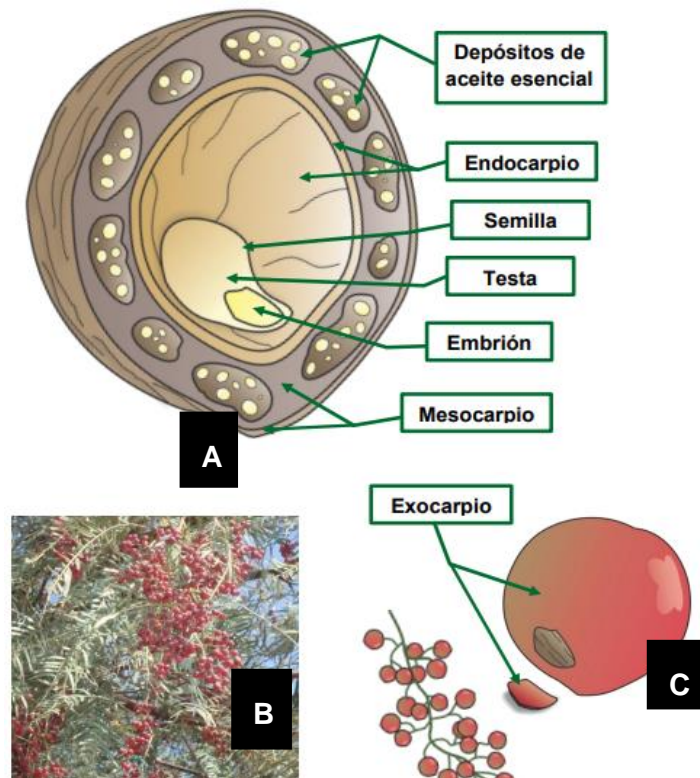
Nombre binomial: *Schinus molle* L.

2.3 SEMILLAS DE MOLLE

Los frutos son redondos y se presentan en racimos de aproximadamente 4 mm a 8 mm de diámetro, en su estado de madurez final son secos y dulces cubiertos de un tipo de cascarilla frágil de color rosado o púrpura (Figura 1).

La semilla tiene un color negruzco a marrón y mide 3 a 5 mm, la textura es rugosa, su sabor es dulce y se parece al de la pimienta en España se le conoce como falsa pimienta, en su composición presenta aceites esenciales que le dan el aroma característico (Magne, 2018).

Figura 1. Partes del fruto de molle.



Nota. Corte transversal del fruto donde se observa que en el mesocarpio se encuentra los azúcares fermentables (A). Vista general del fruto (B). Vista externa del fruto (C).
Extraído de Llanos (2012) (p.92).

2.3.1 Época de cosecha de semillas de molle

El molle comienza a dar frutos en épocas de lluvia enero-marzo, los frutos maduran entre febrero y marzo; los frutos se mantienen durante el año. Es señal de que el fruto está maduro cuando la cascarilla se torna de verde a rosado y esta se desprenda con facilidad. Para la obtención de nuevos brotes de plantas es recomendable cosechar los frutos en las épocas de otoño entre abril- junio. Sin embargo, Juárez (2011) menciona que, para la elaboración de chicha de molle, los frutos se deben cosechar entre enero - marzo cuando estos estén maduros y se debe poner a secar por un periodo de 2 a 3 días.

2.3.2 Composición química de las semillas de molle

Según Limaylla (1995) citado por Juárez (2008), la composición de azúcares de los frutos de *Schinus molle* es: fructosa, manosa y glucosa; la composición de aceites: B-felandreno, a-pineno, carvacrol, o-etil fenol, B- pineno, alcanfor, mirceno, α - felandreno, limoneno, p-cimeno y B-spathuleno; cetonas; alcoholes; terpenos; resinas; entre otros.

Según Lander (1861) y Sica (1884) citados por Maldonado (1920), en los frutos del molle se encuentra aceite esencial, resina, una materia blanda amarillenta que es insoluble en el agua y soluble en éter, benzol, alcohol, que se funde entre 86 °C a 87 °C, una materia blanca insoluble en la potasa, que se funde a 97 °C y un glucósido.

Según Pérez (1981) citado por Maldonado (1920) los frutos contienen glucosa, resina, aceite esencial, pectina, tanino, materia extractiva, celulosa y sales minerales.

Feriani et al. (2020) informa sobre la composición bioquímica de los frutos de molle (*Schinus molle* L) en la Tabla 1 que se muestra a continuación.

Tabla 1. Composición bioquímica del fruto de molle

Componente	Contenido (%)
Carbohidratos	37,12 ± 0,22
Cenizas	17,13 ±0,16
Proteínas	12,13 ±0,02
Lípidos	22,11 ±0,16

Nota. Extraído de Feriani et. al., (2020) (p.2577).

2.3.3 Aceite esencial de frutos de molle

Es un fluido de color ámbar o incoloro, tiene un olor similar al del árbol que hierve a 143 °C, su densidad es de 0,845 g/ml, es insoluble o casi insoluble en el agua, soluble en éter, cloroformo y alcohol (Maldonado,1920).

Llanos (2012) informa que el aceite de frutos de molle está compuesto de Limoneno; α -pineno, β -pineno, β -mirceno y α -felandreno.

Dellacassa (2010) menciona que en la planta piloto del Grupo Yachay de la Pontificia Universidad Católica del Perú se destiló los frutos de molle procedentes de Ayacucho, en la Tabla 2 se menciona los compuestos del aceite esencial.

Tabla 2. Composición del aceite esencial de frutos de molle

Compuesto	Contenido (%)
α -felandreno	30,9
β -pineno	27,5
limoneno	15,3
β - felandreno	12,5
p-cimeno	3,9
α - pineno	2,8
Δ -cadineno	2,7
B –germacreno	1,7
octanoato de metilo	1,3
Γ -cariofileno	1,0
D-germacreno	0,4

Nota. Extraído de Dellacassa (2010) (p.239).

2.3.4 Azúcares de las semillas de molle

Feriani et al (2020) indica que “hasta donde se sabe no hay datos previos disponibles sobre los polisacáridos de *Schinus molle* L. fruto y que el rendimiento de extracción de los polisacáridos de este fruto es de 4,26%”.

En la Tabla 3 se muestra la composición de monosacáridos del fruto de molle el cual se limpió con agua fría durante 10 minutos y se analizó usando usando HPLC-RID .

Tabla 3. Composición bioquímica de monosacáridos del fruto de molle

Monosacárido	Contenido (%)
Arabinosa	40,55 \pm 1,23
Ácido galacturónico	41,15 \pm 2,17
Glucosa	No detectable
Fucosa	10,90 \pm 0,24
Galactosa	7,40 \pm 0,15

Nota. Extraído de Feriani et. al., (2020) (p. 2581).

Extracción de azúcares de semillas de molle

En la investigación de Limaylla (1995) citado por Juárez (2011), sobre el estudio integral de los frutos de molle, menciona que la separación de azúcares del fruto de molle es

realizada por maceración usando como solvente agua tibia por 12 horas y que en estos ensayos existen por lo menos 2 tipos azúcares libres en el fruto de molle, y por lo menos uno de ellos son monómeros de bajo peso molecular.

Paredes et. al., (2019) menciona que los azúcares son diluidos con agua potable a 80 °C por 30 min, mientras que Juárez (2011) en su estudio de optimización de los parámetros para la producción y el envasado de chicha de molle comenta que, el molle no debe hervir junto a las semillas de molle porque conduce a la extracción de sustancias amargas, por eso experimenta la obtención de mosto en una concentración de 1: 3 (semillas de molle y agua) a condiciones de 20 °C, 50 °C y 70 °C por 1 h, 2 h y 3h , los resultados de los °Brix obtenidos se muestran en la Tabla 4; se puede observar que a temperaturas de 70 °C y 2 h de maceración se obtiene un elevado contenido de °Brix en comparación con los demás tratamientos, pero organolépticamente el mosto más agradable fue macerado por 2 h a temperaturas de 50 °C obteniéndose un mosto de 13,8 °Brix.

Tabla 4. Condiciones de maceración de la semilla de molle

Temperatura	Tiempo de maceración		
	1 h	2h	3h
20 °C	12 °Brix	13,4°Brix	14 °Brix
50 °C	12,2 °Brix	13,8°Brix	14,2 °Brix
70°C	12 °Brix	15 °Brix	16 °Brix

Nota. Recopilado de Juárez (2011)

2.3.5 Usos y propiedades de las semillas de molle

Antiguamente, las semillas se utilizaban como sustituto de la pimienta, por su característico picor y aroma. Es conocido en inglés como pepper-tree, y en España le denominan falsa pimienta, también alivia los problemas de menstruación, calma los cólicos, recupera el apetito, es utilizado como purgante para limpiar las lombrices.

Los frutos de molle se usan como saborizante y aromatizante en los alimentos, también se utilizaban en infusión para la retención de orina, en Mexico se usa los frutos molidos para tratar la gonorrea, en Iraq los frutos y hojas en extracto acuoso como enemagogo; en Uruguay para la amenorrea y dismenorrea; en Perú se usa como diurético y bebida fermentada en fiestas patronales; en Pakistan se hizo estudios en perros del extracto acuoso de los frutos y tiene una actividad hipotensiva y estimulante uterino en conejos y ratas. (Dellacassa, 2010)

2.4 PECTINAS

Badui (2006) informa que las pectinas son sustancias que comprende un extenso grupo de heteropolisacáridos vegetales cuya estructura básica está formada por moléculas de ácido D-galacturónico, unidas mediante enlaces glucosídicos α -D-(1,4); se encuentran asociadas con otros hidratos de carbono como hemicelulosa en las paredes celulares de los vegetales.

2.4.1 Extracción de pectina

Según Cabarcas, Guerra y Henao (2012) las pectinas son ácidos pectínicos con contenido medio de éster metílico, solubles en agua caliente; es capaz de formar geles en presencia de sólidos solubles, ácidos o iones polivalentes.

Flores et al., (2013) indican que la hidrólisis ácida es el método más conocido para la obtención de pectina que consiste en someter al sustrato a cocción en medio ácido con HCl a un pH de 1,6 a 2, a tiempo de 30 a 60 minutos y una temperatura entre 85 °C y 90 °C.

Los ácidos pectínicos son solubles en agua y comercialmente se extraen de la pulpa de manzana, remolacha y cascaras de naranja con ácidos a pH 1 - 3.5 y entre 70 °C -90 °C, contienen los grupos carboxílicos del ácido poligalacturónico parcialmente esterificados con metanol (Ferreira, 2007).

El agua es el mejor solvente para las pectinas, son solubles también en formamida, dimetilformamida y glicerina caliente; es insoluble en solventes orgánicos y en soluciones de detergentes cuaternarios. (Rincón, 1990) citado por Cabarcas et. al., (2012).

2.5 CHICHA DE SEMILLAS DE MOLLE

Es un producto que resulta de la fermentación alcohólica de los azúcares de los frutos de molle, Costión(2012) menciona que la producción de esta bebida está asociada con la identidad Wari.La bebida fermentada todavía se produce en los Andes, sin embargo, en el sur del Perú va desapareciendo el conocimiento de su elaboración (Goldstein y Coleman, 2004).

La chicha de molle tiene propiedades benéficas para la salud puesto que en la investigación realizada por Godos y Rodriguez (2017) concluyen que las bacterias lácticas de la chicha de molle de Huanta y Huamanga tienen una capacidad probiótica y favorece el incremento de *Lactobacillus* en la flora intestinal.

2.5.1 Elaboración de la chicha de molle

Verdechaco (2007) indica que los antiguos peruanos hacían una bebida fermentada “la que preparaban restregando los frutos maduros, suavemente, entre las manos en agua caliente, hasta que el agua tuviera sabor dulzaino, procurando no disolver el amargo de estos; este líquido era filtrado en un lienzo, y dejado fermentar durante 3-4 días”

En el trabajo de campo realizado en Moquegua elaboraron la chicha de molle desde la obtención de la materia prima removiendo el exocarpo y tallos de las semillas; una vez retirado la cascarilla hirvieron durante media hora en una olla con agua, canela y clavos de olor; después de enfriar añadieron cucharadas de caña de azúcar, al día siguiente colaron las semillas en un recipiente de cerámica y sellaron la boca del cántaro con una tela mojada manteniendo la humedad durante 10 días de fermentación (Goldstein y Coleman, 2004).

En la comunidad de Santa Bárbara del distrito de Tambillo, provincia Huamanga, departamento de Ayacucho, una de las pobladoras que se dedica a la comercialización de la chicha de molle a quien se denomina pobladora “A” debido a que quiso mantener en privado sus datos, manifiesta que compra semillas de molle descascarilladas, pesa aproximadamente unos 60 kilos de semillas ventiladas, pone a en un cilindro de plástico, añade agua hervida fría a un cilindro de 200 litros y deja en reposo durante 8 horas para que el agua extraiga los azúcares de las semillas, una vez transcurrido el tiempo separa las semillas de la parte líquida, lleva el extracto azucarado a un otro cilindro que tiene restos de chicha ya fermentada, tapa el cilindro, deja fermentar por 3 días, transcurrido los tres días envasa en botellas para comercializarlo. La pobladora “B” indica que recolecta semillas de molle, realiza un tostado de las semillas a fuego lento, frota las semillas, ventila las semillas con ayuda del viento, la semilla ventilada pone en un recipiente con agua hervida fría y para obtener la chicha de molle continua con el mismo procedimiento que realiza la pobladora “A”; la pobladora “C” indica que extrae los azúcares de las semillas de molle con agua caliente realizando una agitación lenta hasta que las semillas queden sin dulzor y pone a fermentar los extractos en vasijas de barro entre 4 y 5 días.

2.5.2 Propiedades fisicoquímicas de la chicha de molle

La bebida fermentada de frutos de molle elaborada a partir de un mosto inicial de 10 °Brix denominada “Chicha 1” durante 10 días a 20 °C y la bebida a partir de un mosto de 12 °Brix con la adición de azúcares denominada “Chicha 2” por 5 días a 22°C tiene las siguientes propiedades fisicoquímicas detalladas en la Tabla 5 y en la Tabla 6 se

detalla los parámetros fisicoquímicos controlados durante la fermentación alcohólica para la obtención de alcohol etílico de molle (Paredes et. al.,1999).

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de dos muestras de chicha de molle

Parámetro	Chicha 1	Chicha 2
Densidad (20 °C)	1,05	1,040
Contenido de Alcohol (%)	6,00	4,00
Acidez total (%)	0,35	0,37
pH	3,84	3,35
Extracto seco (%)	12,12	10,40

Nota. Extraído de Paredes et. al., (1999) (p.68).

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos evaluados durante la fermentación alcohólica, para la obtención de alcohol de molle.

Tiempo de fermentación (días)	pH	° Brix	% Acidez
1	4,0	15,0	0,11
2	3,9	14,0	0,33
3	3,8	10,0	0,35
4	3,6	6,5	0,36
5	3,4	6,0	0,38
6	3,3	5,2	0,39
7	3,3	5,0	0,39

Nota. Extraído de Paredes et. al., (1999) (p.68).

2.6 FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La fermentación alcohólica es un proceso biológico donde las levaduras procesan los hidratos de carbono como la glucosa, sacarosa, fructuosa y almidón para obtener alcohol en forma de etanol, dióxido de carbono gaseoso y moléculas de adenosintrifosfato que consumen los microorganismos en su metabolismo anaeróbico celular energético, la fermentación puede describirse como una glucólisis en la vía

Emden – Meyerhof - Parnas y esta reacción bioquímica se puede ver en la Figura 2 (Bustamante, 2019).

La fermentación alcohólica es el desdoblamiento del azúcar presente en el mosto a alcohol y dióxido de carbono, como consecuencia del desarrollo de un organismo en particular (levadura o fermento alcohólico). Es un proceso que se realiza por acción de las levaduras. La levadura más usada e importante es la *Saccharomyces cerevisiae*, que se utiliza para la elaboración de alcoholes, vinos, cerveza y hasta pan (Kretzschmar, 1961).

En la fermentación los azúcares provenientes de la materia se oxidan hasta ser transformados en piruvato, este proceso es muy semejante a la glucólisis, seguidamente el piruvato se descarboxila y es convertido en acetaldehído donde finalmente es reducido a etanol (García et. al., 2002).

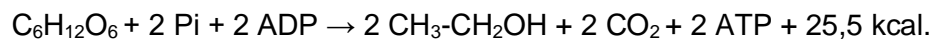
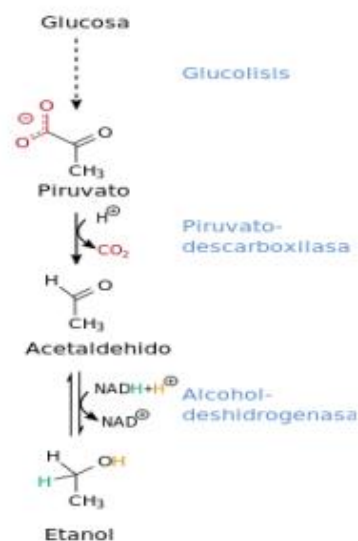


Figura 2. Reacción bioquímica de la fermentación alcohólica.



Nota. Extraído de Scragg (1996).

2.6.1 Factores que afectan al proceso de fermentación

2.6.1.1 Control de temperatura

El desarrollo de los microorganismos depende de la temperatura. Las levaduras son microorganismos mesófilos, estos alcanzan su mayor grado de desarrollo a 20 °C no toleran temperaturas por encima de los 33 °C, a temperaturas inferiores a 13 °C no se

inicia la fermentación, cuanto mayor sea la temperatura en el proceso fermentativo se generará más productos secundarios (Anrango, 2013). De la peña (2006) menciona que el grado alcohólico disminuye a mayor temperatura de fermentación.

Braverman (1980) dice que las levaduras se conservan a 5 °C, a partir de los 36 °C su acción se debilita, mueren sobre los 60 °C y tienen buena acción a 26 °C.

2.6.1.2 Control de pH

El medio en el que las levaduras actúan es a un pH de 4,5 a 7, para la fermentación es recomendable llevar a un pH de 4,5 a 5,5 para que los microorganismos no ataquen al fermento y se eche a perder (Braverman, 1980). En la fermentación el pH óptimo para el sustrato es 3,5 y cuando menor es el pH las levaduras tienen dificultades en la fermentación (Oña,2019).

Según las experimentaciones realizadas en la chicha de jora por Bustamante (2019) elaborada con mosto de maíz de la variedad Marginal 28 a 24 °C el pH desciende de 4,95 a 3,42

2.6.1.3 Aireación

Las levaduras son microorganismos que requieren cierta aireación y este proceso se consigue en los procesos previos, la aireación excesiva puede generar solo agua y dióxido de carbono sin alcohol debido a que las levaduras estarían trabajando en condiciones aeróbicas y la vía fermentativa vendría a ser la oxidativa sin usar los azúcares para la producción de alcohol (Fraizier y Westhoff, 2003).

Durante la fase de incubación es necesario la presencia de aire para que se prolifere de manera adecuada (Bustillo,2008).

2.6.1.4 Enzimas

Son catalizadores para las reacciones químicas, se encuentran en las células vivas de las plantas, las enzimas son proteínas que incrementan la velocidad de las reacciones, la acción enzimática se da generalmente entre 30 °C y 60 °C (Andrade, 2009).

Las enzimas pectinolíticas, también conocidas como pectinasas, se clasifican en esterasa y despolimerasa (liasa e hidrolasa). La enzima esterasa produce ácido péctico y metanol, mientras que la liasa produce oligo o monogalacturonato. Las liasas son utilizadas en la industria vitivinícola para la clarificación de los vinos (Blumenthal et. al., 2021).

La enzima hidrolasa como la poligalacturonasa actúa sobre las uniones de las unidades de ácido galacturónico disminuyendo el peso molecular y por consecuencia cambia las propiedades que dependen de esta característica (disminuye la rigidez de las cáscaras de los frutos) (Cabarcas et. al., 2012).

Andrade (2009) menciona que la acción de la enzima liasa es favorable en la fermentación alcohólica porque facilita el prensado de los frutos y aumenta la producción de colorantes.

2.6.1.5 Concentración de azúcares

La concentración de azúcar define la duración de la fase de multiplicación celular, de la fase estacionaria y la fase de declive; los azúcares deben ser degradados durante la fase de multiplicación debido a que la población es muy activa y viable en esa fase pudiendo así adquirir un grado alcohólico deseado, por ello esta concentración está por encima de los 200 g/L las concentraciones elevadas hacen que las levaduras metabolicen los azúcares en la fase de declive y esto puede dar lugar a fermentaciones incompletas y largas (García y Mamani, 2008).

Los azúcares principales para la fermentación alcohólica son la glucosa y fructuosa porque la levadura principal (*Saccharomyces cerevisiae*) se alimenta de estos sustratos. Los azúcares no consumidos durante la fermentación son denominados azúcares residuales (Pentosas: la xilosa, ramnosa y arabinosa), estos azúcares sirven para darle características organolépticas a las bebidas alcohólicas (Oña, 2019).

2.6.2 Parámetros a controlar en el proceso fermentativo

2.6.2.1 Grados brix

Sarmiento (2013) citado por Bustamante (2019) menciona que este parámetro indica la cantidad de sólidos solubles y se determina por el índice de refracción que se basa por la dirección que se sigue el rayo de luz al incidir sobre un medio con diferente densidad.

2.6.2.2 Acidez

La acidez en los alimentos indica el porcentaje de ácido que predomina, en las frutas predomina el ácido cítrico, la acidez se determina mediante la titulación donde participan tres agentes, el agente colorante, titulante y titulado; la reacción se produce al estar en contacto un ácido con una base y se puede observar al añadir un indicador como la fenolftaleína que es la más usada (Hart, et. al., 1998), citado por Bustamante (2019).

2.6.2.3 Grado alcohólico

El grado alcohólico se determina mediante un instrumento aerómetro también llamado alcoholímetro, el alcoholímetro de Gay Lussac es comúnmente usado, este instrumento esta graduado a 20 °C y da resultado del grado alcohólico en volúmenes (Bustamante, 2019).

Paredes et. al., (1999) obtuvieron bebidas alcohólicas con 4% de etanol a partir de un mosto con 10 °Brix y 6% de etanol a partir de un mosto con 12,5 °Brix.

El Perú la chicha de jora llega a una concentración de 4 a 7 % de alcohol sometidas a una fermentación de un aproximado de 15 a 24 % de azúcares naturales y con una duración de 4 a 6 días (Bustamante, 2019).

2.6.3 Componentes de las bebidas alcohólicas

En las bebidas alcohólicas se encuentra el etanol que es un líquido incoloro de sabor ardiente y olor agradable, ácidos orgánicos (ácido acético, butírico, fórmico, propiónico, láctico, pelergónico, isovalerianico, cáprico, caprónico e isovalerianico) que en cantidades modestas favorece el aroma y gusto de las bebidas alcohólicas; ésteres, aldehídos, metanol y alcoholes superiores que producen efectos tóxicos agudos a concentraciones elevadas resultando un riesgo para la salud de los consumidores (Gutierrez,2014).

Su presencia se da por la formación durante el proceso de fermentación, añejamiento y en menor cantidad durante la destilación por la interacción del alcohol etílico y los ácidos orgánicos, los esteres proporcionan a la bebida alcohólica sabor y aroma característicos de la materia prima (Humerez,2018).

La producción de alcoholes superiores como el enántico que es el más abundante en la fermentación se debe a la desaminación y descaboxilación de determinados aminoácidos, otros pueden ser el enántico, el propílico, el butílico, etc. (Carbonell, 1970) citado por Andrade (2009).

2.7 METANOL

El metanol (CH₃OH) también denominado alcohol "de madera" porque originalmente se obtenía a partir de la destilación de esta materia prima en ausencia de aire, en la actualidad se puede producir a partir de gas natural, carbón, madera, e incluso de residuos orgánicos (biomasa celulósica). Es el más simple de los alcoholes, se caracteriza por ser incoloro, inflamable y volátil con un punto de ebullición a 64,7 °C; el metanol no es un producto de la fermentación alcohólica, debido a que su presencia en

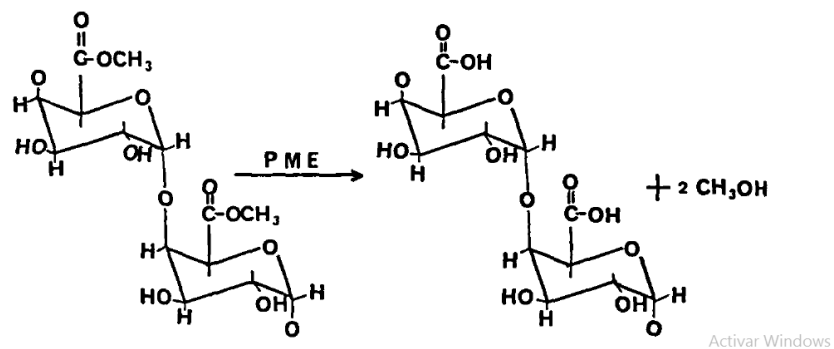
este tipo de bebidas se origina por la desesterificación de las pectinas esterificadas propio de las frutas (Sánchez, 2005).

2.7.1 Origen del metanol

En el proceso de fermentación de licores a base de frutas se origina metanol a partir de la hidrólisis de materias pécticas (Díaz, 2020). Bindler et. al., (2009) indican que en la reacción interviene la enzima pectinmetilesterasa y Solis et. al., (2019) menciona que dicha reacción es una desmetoxilación.

La acción de las enzimas sobre las pectinas es de dos tipos en la que actúa la pectinmetilesterasa (PME) que ataca a los grupos carboxilo esterificados con metanol liberando metanol y ácidos; la poligalacturonasa (PG) que ataca las uniones de las unidades de ácido galacturónicos como consecuencia disminuye el peso molecular y así cambiando las propiedades que depende de estas características (Ferreira, 2007). Bindler et. al., (2009) mencionan que las pectinmetilesterasas catalizan la hidrólisis de los grupos metoxilados pectina, lo que conduce a la liberación de metanol y a la aparición de funciones ácidas en la cadena galacturónica, es decir, a la transformación de la pectina en ácido péctico.

Figura 3. Mecanismo de acción de la enzima pectinmetilesterasa



Nota. Extraído de Blinder, Voges y Laugel (2009) p. 345.

2.7.2 Concentración de metanol en bebidas alcohólicas

En la Tabla 7 se muestra una recopilación de los resultados obtenidos en diversas investigaciones acerca de la concentración de metanol en licores de diversas frutas.

Tabla 7. Contenido de metanol en licores a partir de frutas.

Producto fermentado	Metanol (g/L de 100 ml de 100% vol. Alcohol)		Metanol (mg/100 ml de 100% vol. Alcohol)		Referencia
	Min.	Max.	Min.	Max.	
	Ciruela	4,5	12,7	450	
	2,9	11,4	290	1140	Winterova et al.(2008)
	2,5	19	250	1900	Kostik et al. (2013)
	6,7	9,4	670	940	Popovic et al.(2019)
Manzana	6,8	10,1	680	1010	Versini et al. (2009)
	6,0	11,9	600	1190	Coldea et al. (2011)
	4,3	11,5	430	1150	Cuelgue y Woodams (2010)
Pera	0,9	10,8	90	1080	Winterova et al.(2008)
	8,2	12,9	820	1290	Coldea et al.(2011)
	4,3	10,4	430	1040	Versini et al. (2012)
Albaricoque	6,7	12,1	670	1210	Winterova et al.(2008)

Nota. Acondicionado de Botelho, et. al, (2020).

2.7.3 Límites de metanol permitidos en las bebidas alcohólicas

En la Tabla 8 se plasma los límites de metanol permitidos en diferentes bebidas alcohólicas; Blumenthal et. al., (2021) indica que el límite máximo permitido de metanol en las bebidas alcohólicas de frutas tiene un factor de seguridad de 5 inferior al de otros componentes tóxicos de alimentos por lo que debe ser controlado por la industria y dar el cumplimiento estricto de los límites.

Tabla 8. Especificación de los límites máximos permitidos de metanol

Bebidas	Límite máximo de metanol	Referencia
Pisco puro	100 mg /100 ml AA	NTP211.001 (2006)
Vino tinto	400 mg/L	NTP 212.014 (2011)
Vino blanco y rosado	250 mg/L	NTP 212.014 (2011)
Licores	100 mg/100 ml AA	NTP 211.009 (2012)
Aguardiente de caña	30 mg/100 ml AA	NTP 211.010 (2015)
Sidra	300 mg/100 ml AA	NTP 210.026 (2007)
Aguardientes de frutas producidos a partir de las siguientes frutas: Ciruela , ciruela damascena , ciruela Maribel, manzana, pera, melocotón, albaricoque, zarzamora y frambuesa.	1200 g/hl AA	Reglamento UE (2019)
Aguardientes de frutas producidos a partir del membrillo y baya del sauco,	1350 g/hl AA	Reglamento UE (2019)
Bebidas alcohólicas fermentadas	300 mg /100 ml AA	NOM-142-SSA1-1995

Nota. "AA" se refiere a que el contenido de metanol es expresado en base a alcohol anhidrido y los que no indican es que el contenido fue expresado en base a la bebida alcohólica.

2.7.4 Toxicidad del metanol

La intoxicación por metanol generalmente se da por vía digestiva a causa del consumo de bebidas alcohólicas adulteradas, también se da por vía cutánea o respiratoria; el metanol al degradarse produce ácido fórmico y formaldehído ocasionando una acidosis letal y por ende la pérdida de la vista (Gonzales et. al.,2020).

Arellano (2021) menciona que los síntomas por intoxicación con metanol son: “Cefalea, ataxia, vértigo, insomnio, dolor, parestesias y enfriamiento de manos y antebrazos, alteración del estado de conciencia, convulsiones, edema de retina, ceguera, acidosis metabólica severa y pancreatitis hemorrágica tardía” (2021, p. 149).

La Food and Drug Administration de Estados Unidos menciona: “Un nivel tolerable es 7,1 a 8,4 mg de metanol por kg de peso por día o aproximadamente, 426 a 504 mg/persona/día para un adulto de 60 kg” (FDA, 1996) (p. 26786).

Röe (1982) indica que: “1 g de metanol por cada kg de peso corporal puede causar la muerte si el paciente no recibe tratamiento o no ha consumido etanol” (p.275).

Bindler et. al., (2009) mencionan que la ingesta entre 60 a 100 ml de metanol es letal, pero al parecer varía de un sujeto a otro y que una cucharadita o 20 ml de metanol provoca la ceguera mientras que Paine y Dayan (2001) informan que la dosis tóxica diaria para un adulto es de 8 g de metanol y la dosis diaria segura es de 2 g. Para 100 ml de una bebida espirituosa de 40% de alcohol la concentración tolerable es de 2% vol. de metanol que equivale a 5000 g/hL AA, el límite de metanol permitido por la UE para licores de frutas es 1000 g/hL; esto indica que la norma ofrece un margen de seguridad de 5 (Bindler et. al., 2009).

La concentración de metanol en la sangre superior a 1500 y 2000 mg/L causa la muerte a pacientes no tratados y una concentración superior a 500 mg /L genera efectos tóxicos graves generando mareos, pérdida de conocimiento, dificultad para respirar, visión borrosa, ceguera, debilidad, diarrea, pérdida de peso, dolores abdominales, dolor de cabeza, náuseas y vómitos (Ohimain, 2016).

2.7.5 Factores que influyen en la generación de metanol

Los factores que influyen en la generación de metanol son el contenido de pectina, la temperatura de esterilización, la edad fisiológica de la materia prima, el tamaño, y la actividad de la enzima pectinmetilesterasa (óptima entre 50 y 60°C) (Ohimain, 2016).

Blinder et. al., (2009) indican que “La tasa de producción de metanol está directamente relacionada con la naturaleza y la cantidad de sustancias pécticas presentes en la fruta, así como a la cantidad de enzima puesto en contacto con dicho sustrato.” p (344)

La fermentación espontánea de manera artesanal en la que no se realizan controles efectivos de higiene se da la fermentación en presencia de hongos, levaduras y bacterias; los microbios pueden conllevar a producir metanol y diversos productos. La presencia de enzimas pectinolíticas en las levaduras es una de las causas de generación

de metanol las cuales se clasifican en esterasas y despolimerasas (hidrolasas y liasas); las liasas conducen a la hidrólisis de la pectina generando oligo o monogalacturonato mientras que las enzimas esterasas realizan la hidrólisis generando ácido péctico y metanol (Ohimain, 2016).

En los estudios realizados con frutos de madroño se concluyó que los frutos muy maduros produjeron bebidas con mayor contenido de metanol (Kraut y Kurtz, 2008) citado por Botelho et.al., (2020).

Para tratar las pectinas se somete los frutos de níspero serrano a temperatura de 85 y 95 °C por 15 minutos para inactivar las enzimas pectinesterasas responsables de la hidrólisis de los grupos de ésteres metílicos que forman metanol y pectinas de menor metoxilo; inactivando de igual forma a la poligalacturonasa que rompe los enlaces glucosídicos entre las moléculas galacturónicas para llegar finalmente a ácido galacturónico (Carbonell et. al, 1990).

Se realizó un estudio sobre la influencia de la variedad de manzana y la pasteurización a 85 °C del jugo sobre el contenido de metanol de la sidra dura y el aguardiente; el cual concluye que existe diferencia significativa de la pasteurización debido a que el aguardiente elaborado con jugos de manzana Crispín con mosto pasteurizado presentó un promedio de 217 mg/100 ml de etanol al 40% y el de mosto sin pasteurizar 400 mg/100 ml de etanol al 40% (Hang y Woodams, 2010).

2.7.6 Determinación de metanol por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier con reflectancia total atenuada FTIR-ATR

Es una técnica de análisis no destructiva que permite registrar espectros de infrarrojos, el equipo emite una fuente de radiación a un dispositivo de selección de longitud de onda que mide la intensidad de luz detectada y lo convierte en señales eléctricas en un sistema informático de datos espectrales el cual se usa para análisis químico métricos. La quimiometría consiste en la interpretación de espectros mediante métodos gráficos, y estadísticos para determinar los componentes de una muestra (Bouhzam, 2020).

La espectroscopia y aparatos ATR (reflectancia total atenuada) son ventajosos en el análisis debido a la practicidad, buena eficiencia y rentabilidad ya que no se necesita un volumen de muestra grande, no requiere tratamiento previo de las muestras (Anjos et al., 2016).

Anjos et. al., (2016) utilizó el método espectroscopía FTIR con reflectancia total atenuada en la región de 4000 – 400 cm^{-1} para predecir el contenido de metanol en aguardientes derivados de uva mediante la regresión de mínimos cuadrados parciales

obteniendo valores de metanol entre 30 – 2224 g/hl AA resultados que coincidieron con el método de cromatografía de gases.

En el estudio de análisis de metanol y etanol de aguardientes de frutas se analizó mediante espectroscopía FTIR; se registró los espectros entre 3500 - 750 cm^{-1} y se predijo la concentración de metanol mediante una curva patrón utilizando la regresión PLS con un coeficiente de correlación de 0,9855 basándose en el área de los picos teniendo en cuenta que el metanol puro tiene una frecuencia específica de vibración a 1020 cm^{-1} con mayor intensidad y a 1112 cm^{-1} con menor intensidad. La concentración de metanol obtenidos en brandis de ciruelo fue de 755,55 a 926,54 (g/100 g de aguardiente de fruta); en brandis de manzana 822,32 a 878,57 (g/100 g de aguardiente de fruta) y en brandis de pera 881,89 a 1045,89 (g/100 g de aguardiente de fruta) (Coldea, 2013).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LUGAR DE EJECUCIÓN DEL TRABAJO

Los análisis físicos y químicos de los extractos azucarados de las semillas de molle y de los extractos azucarados fermentados fueron ejecutados en el Laboratorio de Investigación de la escuela de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2 PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

3.2.1 Nivel de investigación

El nivel de la investigación es experimental debido a que se tiene variables independientes (tiempo y temperatura) que fueron manipuladas con el fin de obtener extractos azucarados de semillas de molle (mosto) y una bebida fermentada a partir de estos extractos azucarados, la variable dependiente principal fue el contenido de metanol en la bebida fermentada de semillas de molle. Las características fisicoquímicas del mosto y la bebida fermentada (°Brix, densidad, % de pectina, % de etanol, pH, acidez total, acidez volátil), vienen a ser las variables dependientes secundarias que también fueron cuantificadas durante el desarrollo de la investigación.

3.2.2 Tipo de investigación

El presente estudio pertenece a un tipo de investigación cuantitativa según el manejo de las variables y también es de tipo aplicada ya que se usarán los conocimientos en la práctica.

3.2.3 Tipo de análisis estadístico

Para el presente trabajo de investigación se utilizó el análisis estadístico (ANOVA) con un nivel de confianza al 95 % en el software estadístico denominado Minitab 18.

3.3 MATERIALES

3.3.1 Equipos

- Agitador mecánico
- Alcoholímetro de Gay Lussac
- Balanza analítica
- Densímetro
- Fermentador
- Destilador Kjeldahl
- Espectrofotómetro FTIR Nicolet is 10
- Horno
- Refractómetro de Abbe
- Termómetro digital

3.3.2 Materiales

- Bureta de 10 ml
- Fiola de 25 ml y 1L
- Matraz de Erlenmeyer de 100 ml , 250 y 500 ml
- Micropipetas de 10 a 100 μ L,
- Pipeta de 5 ml
- Probeta de 100 y 250 ml
- Tubos de ensayo
- Vasos precipitados de 10 ml , 50 ml y 250 ml

3.3.3 Reactivos

- Alcohol etílico
- Ácido clorhídrico 1.5 N
- Agua destilada
- Isopropanol
- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Fenolftaleína
- Metanol puro

3.3.4 Software

- Minitab 18
- Omnic
- TQ analyst

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Tratamiento inicial de las semillas de molle

Las semillas maduras que poseen color rosado fueron compradas de la comunidad de Santa Bárbara y puestas a secar al sol por un periodo de tres días, una vez seca las semillas se estrujaron hasta que las cascarillas se desprendan de las semillas; finalmente se ventiló con una ventiladora eléctrica para eliminar las cascarillas (Figura 4) y ser almacenados en un lugar seco hasta el momento de ser procesado.

Figura 4. Semillas de molle ventiladas



3.4.2 Extracción de azúcares

Para la extracción de azúcares fermentables de las semillas de molle se empleó un diseño factorial con 2 factores y cada uno con 3 niveles, la investigación presentó 27 unidades experimentales ya que para cada nivel se tuvo 3 repeticiones. En la Tabla 9 se describe los factores y niveles de experimentación; en la Tabla 10 se muestra las respuestas de los tratamientos y sus unidades de medida y en la Tabla 11 se detalla los tratamientos experimentales de la investigación y los códigos respectivos de cada

extracto azucarado obtenido con los distintos tratamientos que en adelante serán mencionados.

Tabla 9. Factores y niveles experimentales en la extracción de azúcares.

Factores	Descripción del factor	Descripción del nivel
A	Temperatura del agua (°C)	20
		55
		90
B	Tiempo de extracción (min)	10
		20
		30

Tabla 10. Respuesta de los tratamientos y sus unidades de medida.

Respuesta	Unidad de medida
Concentración de azúcares	°Brix
Densidad	g/ml
Concentración de iones hidrógeno	pH
Acidez total	% Ac. Tartárico
Concentración de pectina	%

Tabla 11. Diseño experimental en la extracción de azúcares.

Corrida	Código	Factor A	Factor B
		Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	2015 a	20	15
2	2030 a	20	30
3	2045 a	20	45
4	5515 a	55	15
5	5530 a	55	30
6	5545 a	55	45
7	9015 a	90	15
8	9030 a	90	30
9	9045 a	90	45
10	2015 b	20	15
11	2030 b	20	30
12	2045 b	20	45
13	5515 b	55	15
14	5530 b	55	30
15	5545 b	55	45
16	9015 b	90	15
17	9030 b	90	30
18	9045 b	90	45
19	2015 c	20	15
20	2030 c	20	30
21	2045 c	20	45
22	5515 c	55	15
23	5530 c	55	30
24	5545 c	55	45
25	9015 c	90	15
26	9030 c	90	30
27	9045 c	90	45

Para el procedimiento de extracción de azúcares fermentables de semillas de molle se realizó teniendo en cuenta la relación de semillas de molle: agua (1: 2,86), se pesaron las semillas posteriormente se sumergieron en agua a temperatura de 20 °C por 15 minutos, 20 °C por 30 minutos, 20 °C por 45 minutos, 55 °C por 15 minutos, 55 °C por 30 minutos, 55°C por 45 minutos, 90 °C por 15 minutos, 90 °C por 30 minutos y 90 °C por 45 minutos a una velocidad de agitación de 120 rpm.

Una vez concluido el tiempo de extracción, se realizó el primer filtrado con un colador y el segundo filtrado con una tela poliéster hasta separar la parte solida de la liquida, como se muestra en la Figura 5.

Figura 5. Procedimiento de extracción de azúcares fermentables de semillas de molle



Nota. Incorporación de frutos pesados a un recipiente con agua (A), control de temperatura (B), primera filtración para separar las semillas (C) y segunda filtración del mosto obtenido (D).

3.4.2.1 Determinación de pectina del extracto azucarado de semillas de molle

La determinación de pectina se realizó con el método gravimétrico teniendo en cuenta el proceso de extracción de Fredes et. al., (2009); la concentración de pectina disuelta en el mosto se analizó mediante hidrolisis ácida con HCl 1,5 N llevando las muestras de mosto extraído hasta un pH de 2,5, se calentó durante 1 hora los mostos acidificados hasta una temperatura de 89 °C, se filtró con papel filtro en caliente para eliminar impurezas, se enfrió hasta 20 °C y se adicionó alcohol etílico de 96 % en una proporción de 1:1 respecto al mosto acidificado y se dejó en reposo por 30 min hasta coagular la pectina, esta fue separada por filtración (Figura 6); una vez filtrado se llevó a secar a una temperatura de 45 °C por 24 horas, se enfrió y se pesó los papeles con muestras de pectina extraída. Se calculó el porcentaje de pectina extraído con la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Pectina extraído} = \frac{PM - P}{Pm} * 100$$

Donde:

P : Peso del papel filtro

PM : Peso del papel y muestra seca

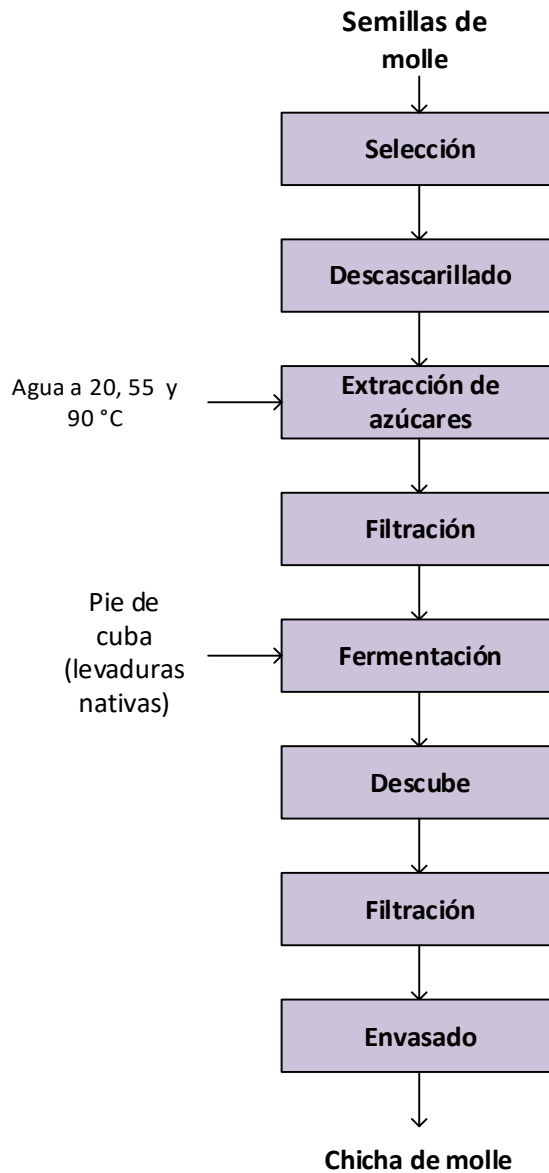
Pm : Peso de la muestra

Figura 6. Extracción de pectina de los extractos azucarados



3.4.3 Elaboración de la bebida fermentada de semillas de molle (chicha de molle)

Figura 7. Diagrama de bloques del proceso de elaboración de chicha de semillas de molle



3.4.3.1 Manejo del inóculo

Las levaduras nativas se reprodujeron a partir de una botella de chicha de semillas de molle que se encontraba en fermentación; el origen de esta bebida fue de la comunidad de Santa Bárbara ubicado en el distrito de Tambillo, Provincia de Huamanga, región

Ayacucho. La reproducción de las levaduras nativas se realizó siguiendo los pasos que a continuación se detalla:

- Se elaboró un mosto extrayendo los azúcares fermentables de semillas de molle a una temperatura de 20 °C y 15 minutos.
- El mosto extraído se pasteurizó a 80 °C por 15 segundos y se dejó enfriar hasta 20 °C.
- Al mosto se le agregó 30 ppm de metabisulfito de sodio y se dejó en reposo 10 minutos.
- Se añadió 55 ml de la chicha de semillas de molle a 1700 ml de mosto extraído y esto se dejó en un fermentador a temperatura constante de 24,5 °C por un periodo de 3 días (Figura 8).

Figura 8. Mosto con levaduras nativas reproducidas



3.4.3.2 Fermentación alcohólica de los extractos azucarados de semillas de molle

La bebida fermentada de semillas de molle se obtuvo de la conversión de los azúcares presentes en los extractos azucarados obtenidos de las semillas (mostos) en alcohol.

Se agregó 55 ml de inóculo (elaborado con el procedimiento que indica el "ítem 3.4.3.1") a todos los extractos azucarados obtenidos, los extractos azucarados fueron llevados a fermentación a temperaturas de ambiente.

La temperatura fue evaluada cada 24 h entre las 2 p. m. y 4 p. m con un termómetro digital por un periodo 7 días, los resultados de la evaluación de temperatura de los extractos azucarados en fermentación se muestra en la Tabla 22.

La fermentación se realizó en botellas transparentes con tapas acondicionadas con mangueras de 4 mm de espesor como se observa en la Figura 9, por donde se liberó y condujo el CO₂ a un recipiente con agua impidiendo el paso del oxígeno. Una vez concluida la fermentación alcohólica se realizó el descube y filtración para ser almacenado en botellas esterilizadas de 1,5 L.

Figura 9. Fermentación alcohólica de los extractos azucarados



3.4.4 Caracterización fisicoquímica

3.4.4.1 Determinación de densidad

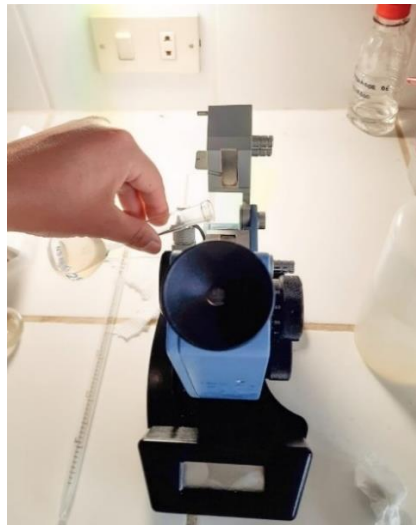
La densidad se determinó mediante el método aerométrico; la densidad se determinó antes de iniciar y al finalizar la fermentación cuando las botellas dejaron de expulsar CO₂, se colocó 250 ml de bebida a 20 °C en una probeta, se sumergió un densímetro, se esperó unos segundos hasta que el instrumento se estabilice y se registró el valor de la densidad en la base del menisco formado (García y Xirau, 2005)

3.4.4.2 Determinación de °Brix

El grado brix se determinó mediante el método refractométrico con un instrumento denominado refractómetro que se basa en la dirección que se sigue el rayo de luz al incidir sobre un medio con diferente densidad y mide la materia seca (generalmente azúcares) disuelta en un líquido (Bustamante,2019) y (Oña, 2020).

La determinación se realizó antes, durante y después de la fermentación, se colocó entre 3 a 4 gotas en el prisma del refractómetro a una temperatura de 20 °C, se procedió a observar y nivelar el refractómetro con el prisma movable hasta que la luz atravesada coincida en el centro del círculo que se encuentra en la intersección de dos líneas en el refractómetro, se dio la lectura y se registró los datos cada 24 horas hasta el término de la fermentación alcohólica.

Figura 10. Determinación de °Brix



3.4.4.3 Determinación de pH

El pH se determinó mediante el método potenciométrico con un instrumento denominado pH - metro que mide la diferencia de potencial entre dos electrodos: un electrodo de vidrio sensible al hidrógeno ion y un electrodo de referencia de plata o cloruro de plata (Oña, 2020).

Se calibró el pH - metro mediante dos soluciones tampón, una de pH 4 y otra de pH 7, para ello se extrajo 20 ml de las soluciones tampón en un vaso precipitado, se sumergió el electrodo a la solución tampón, se presionó el botón cal y se esperó a que en la pantalla de pH - metro indique el valor de pH de la solución tampón.

Se determinó el pH de los extractos azucarados, de los mostos en fermentación y de la bebida fermentada, para ello se extrajo 15 ml de muestra en un vaso precipitado a 20°C, se esperó hasta que el valor se estabilice en la pantalla digital, el proceso se realizó cada 24 horas desde el día de extracción del mosto hasta el último día de fermentación.

Figura 11. Determinación de pH



3.4.4.4 Determinación de grados alcohólicos (NTP.212.030.2019)

Los grados alcohólicos se determinó cuando la fermentación finalizó, se enrasó la muestra (bebida fermentada de semillas de molle) en una fiola de 200 ml y se llevó al equipo destilador, una vez iniciada la destilación se recogió 180 ml de destilado, se enfrió hasta la temperatura de 20 °C, la muestra destilada se enrasó con agua destilada hasta completar los 200 ml, se introdujo el alcoholímetro en una probeta de 100 ml y se dio la lectura cuando el alcoholímetro se mantuvo en reposo (INACAL, 2019).

Figura 12. Lectura de grados alcohólicos de la muestra destilada



3.4.4.5 Determinación de acidez total (NTP.211.040.2018)

La acidez total se determinó valorando con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N, se preparó en un matraz 5 ml de muestra (bebida fermentada de semillas de molle) diluida en 100 ml de agua destilada y se procedió a valorar usando como indicador gotas de fenolftaleína, se tomó datos del volumen de gasto y se calculó con la siguiente fórmula (INACAL, 2018)

$$\% AT = \frac{N \times VG \times 0.075 \times 100}{VM}$$

Donde:

% AT : Porcentaje de acidez total expresado en ácido tartárico

N: Normalidad de la solución de NaOH

VG : Volumen de gasto de NaOH (ml)

VM: Volumen de muestra (ml)

3.4.4.6 Determinación de acidez volátil (NTP.211.040.2018)

La acidez volátil se determinó al finalizar la fermentación después de haber destilado 200 ml de muestra (bebida fermentada de semillas de molle destilada y llevada al volumen inicial de la bebida) del cual se separó 25 ml, se añadió unas gotas fenolftaleína y se procedió a valorar con una solución de NaOH 0.1 N hasta que el color rosado sea persistente (INACAL, 2018).

$$\% AV = \frac{N \times VG \times 0.060 \times 100}{VM}$$

Donde:

% AV : Porcentaje de acidez total expresado en ácido acético

N: Normalidad de la solución de NaOH

VG : Volumen de gasto de NaOH (ml)

VM: Volumen de muestra (ml)

3.4.4.7 Determinación de metanol por espectroscopía FTIR - ATR

El análisis de metanol se realizó por la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-ATR) teniendo como referencia a los estudios realizados por Anjos et al. (2016) y Coldea (2013). La muestra se analizó con un diamante ATR utilizando el rango infrarrojo medio (400 - 4000 cm^{-1}) con 32 escaneos por espectro, los datos de los

espectros obtenidos se registraron con el software OMNIC y se cuantificó mediante una curva patrón con el método de regresión PLS realizado en el software TQ Analyst.

Para el análisis de metanol se elaboró soluciones patrón con una solución madre de etanol al 3% al que se añadió metanol en concentraciones de 0,5 g, 1 g, 2 g, 3 y 5 g a una fiola de 1 litro el cual se enrazó con la solución de etanol. Las soluciones patrón de metanol equivalen a una concentración de 0 mg /100 ml, 50 mg/100 ml, 100 mg/100 ml, 200 mg/100 ml, 300 mg/100 ml y 500 mg/100 ml.

Se destiló 100 ml de bebida fermentada de semillas de molle y se obtuvo 90 ml de alcohol destilado, este destilado fue llevado al volumen inicial de la muestra (100 ml de bebida fermentada) completando con agua destilada.

El análisis de lectura espectral se realizó de las soluciones patrón y de las muestras destiladas llevadas al volumen inicial de la bebida fermentada; una vez listas las muestras se continuó con el siguiente procedimiento:

- Se limpió cuidadosamente el cristal ATR con isopropanol y papel tisú antes de tomar las muestras.
- Se realizó la medición de fondo cada 30 minutos
- Se tomó las muestras por triplicado recogiendo 15 ul de destilado directamente de las botellas con una micropipeta de punta desechable el cual se cambió en cada lectura para evitar la contaminación de las muestras.
- Se colocó las muestras en el cristal ATR de tal manera que el cristal quede completamente cubierto, una vez puesta la muestra se procedió a dar inicio de la corrida espectral manteniendo la temperatura de ambiente constante a 20 °C.
- Finalizada la lectura se guardó el espectro realizando una corrección avanzada ATR a tal manera de eliminar interferencias.

Como siguiente paso se realizó la construcción de la curva patrón (Anexo 3) para la cuantificación de metanol con el software TQ Analyst mediante la técnica de calibración de mínimos cuadrados parciales (PLS) el cual se acondicionó mejor a las condiciones de los datos espectrales y dió mayor precisión. Se introdujo a la base de datos la lectura espectral de las muestras patrón, se seleccionó el rango de trabajo entre 997,50 cm^{-1} - 1028,35 para la estimación de áreas con una línea base entre el punto a 1020,64 cm^{-1} y 1008,59 cm^{-1} . (Anexo 2), después de establecer los parámetros se calibró la curva y finalmente se seleccionó las muestras de la base de datos para la cuantificación de metanol.

Figura 13. Lectura de espectros de los patrones y las muestras.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y ESTADÍSTICO DEL EXTRACTO AZUCARADO

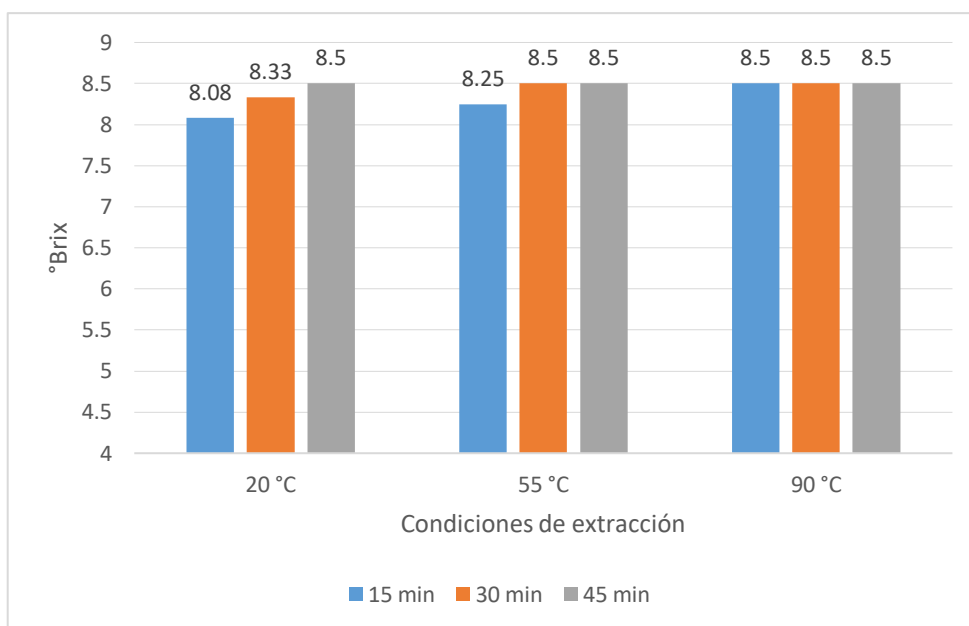
4.1.1 Análisis de °Brix de los extractos azucarados de semillas de molles

En la Tabla 12 se reporta la concentración de azúcares fermentables de las semillas de molle (°Brix a 20 °C) de las extracciones realizadas a 120 rpm y con una relación de molle: agua (1: 2,86)

Tabla 12. °Brix de los extractos azucarados de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	°Brix promedio
1	20	15	2015	8,08 ± 0,14
2	20	30	2030	8,33 ± 0,38
3	20	45	2045	8,50 ± 0,25
4	55	15	5515	8,25 ± 0,00
5	55	30	5530	8,50 ± 0,00
6	55	45	5545	8,50 ± 0,00
7	90	15	9015	8,50 ± 0,25
8	90	30	9030	8,50 ± 0,00
9	90	45	9045	8,50 ± 0,00

Figura 14. Comportamiento de la concentración de azúcares fermentables (°Brix) obtenidos a distintas temperaturas y tiempos de extracción



En la Figura 14 se observa que con la extracción de azúcares realizada a 20°C tiene una concentración máxima de azúcares (8,5 °Brix) a los 45 min de extracción, mientras que con la extracción realizada a 55 °C logra llegar a 8,5 °Brix en el minuto 30 y con la extracción realizada a 90°C llega a 8,5 °Brix en el minuto 15 de la extracción; esto se debe a que los azúcares son sólidos solubles en el agua y para la disolución de estos azúcares es recomendable disponer de altas temperaturas. Los azúcares de las semillas de molle no están del todo libres en la pared superior de las semillas y como esta pared es carnosa y compacta el solvente se demora en llegar a los azúcares durante los primeros minutos y a temperaturas bajas. Lo enunciado se contrasta con Jiménez, et al. (2012) quienes en su estudio obtuvieron azúcares fermentables de betarraga a temperaturas de 50, 70 y 90 °C, ellos reportan una diferencia de rendimiento del 10,45% entre la extracción a 50 °C y 90° C y se puede observar que a mayor temperatura de extracción el rendimiento de extracción de los azúcares fermentables es superior.

Según Paredes et. al., (1999) la extracción de azúcares para la elaboración de chicha de molle se realiza a una temperatura de 80°C por 30 minutos y se obtiene un alcohol de 4 % con una concentración inicial de extracto de 10 °Brix pero no reporta la relación de agua y semillas de molle, posiblemente se haya usado mayor cantidad de semillas de molle en comparación con los tratamientos realizados.

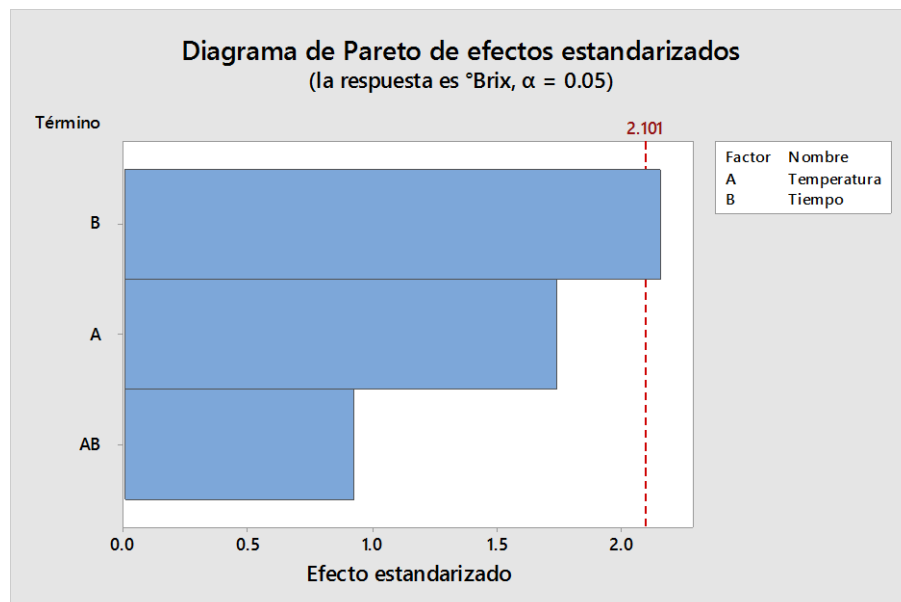
Los azúcares son sustratos principales para que se dé el proceso de fermentación. Sin embargo, la concentración por encima de los 200 g/L puede inhibir el desarrollo de las

levaduras como resultado de una elevada presión osmótica Bustamante (2019), García y Mamani (2008).

Las cantidades de azúcares de semillas de molle disueltos en los extractos no superan el límite establecido por García y Mamani (2008), la concentración de azúcares ($8,40 \pm 0,20$ °Brix) en los extractos obtenidos está por encima de lo indicado por Oña (2019) quien menciona que los azúcares se deben encontrar por encima de los 20 g /L (2 °Brix) para que transcurra la fermentación alcohólica.

Los °Brix de los extractos azucarados obtenidos con los distintos tratamientos tiene un $\Delta = 0,42$, por lo tanto, al incrementar el tiempo y temperatura de extracción no se da un incremento considerable de azúcares en los extractos.

Figura 15. Diagrama de Pareto para °Brix de los extractos azucarados de semillas de molle



En el Anexo 11 se puede observar que la variación entre los tratamientos sobre la concentración de azúcares es mínima y estadísticamente no es significativa ($p > 0,05$). Sin embargo, en la Figura 15 y en el Anexo 11 se puede observar que el tiempo de extracción influye estadísticamente ($p = 0,04$) de manera independiente en la concentración de azúcares de los extractos.

4.1.2 Análisis de densidad de los extractos azucarados de semillas de molle

La densidad de los extractos azucarados fue tomado a 20 °C

Tabla 13. Densidad de los extractos azucarados de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	Densidad promedio a 20°C (g/ml)
1	20	15	2015	1,030 ± 0,001
2	20	30	2030	1,031 ± 0,002
3	20	45	2045	1,032 ± 0,001
4	55	15	5515	1,031 ± 0,001
5	55	30	5530	1,032 ± 0,000
6	55	45	5545	1,032 ± 0,000
7	90	15	9015	1,032 ± 0,001
8	90	30	9030	1,032 ± 0,000
9	90	45	9045	1,032 ± 0,000

En la Tabla 13 se observa que la densidad de los extractos azucarados se encuentra entre 1,030 y 1,032 g /ml y el incremento de las densidades tiene un comportamiento similar al de los °Brix ya que ambas medidas están relacionadas directamente. La densidad de los extractos está relacionada con la concentración de azúcares, esto se contrasta con la tabla de correspondencia de LAFFORT (Anexo 1) donde indica que la densidad de los extractos azucarados está relacionada con los °Brix se asemejan a los resultados obtenidos en la extracción donde a la densidad de 1,032 le correspondería 8,2 °Brix.

De acuerdo al análisis de varianza (Anexo 12) los tratamientos ni los factores son estadísticamente significativos ($p = 0,42 > 0,05$) sobre la densidad de los extractos azucarados de semillas de molle.

4.1.3 Análisis de pH de los extractos azucarados de semillas de molle

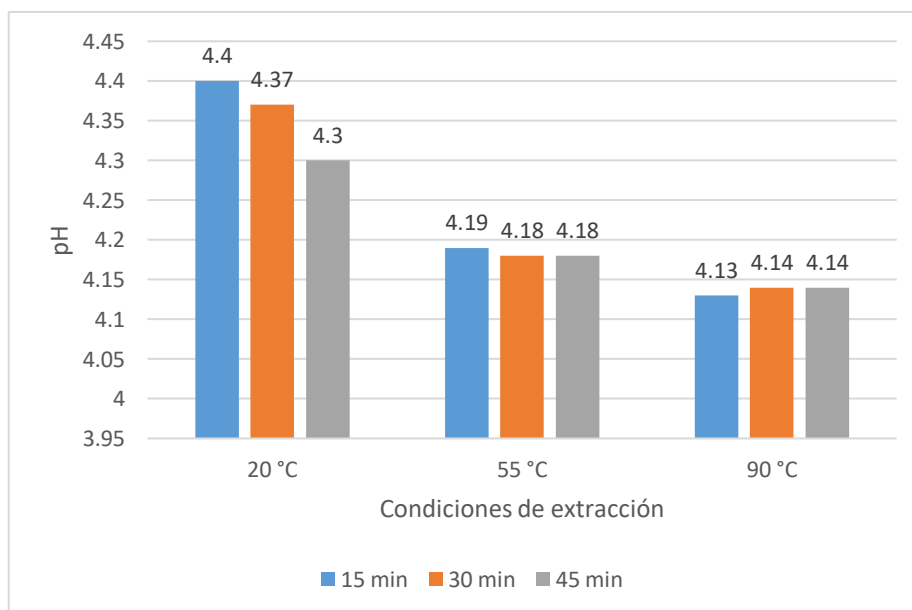
El pH de los extractos azucarados (obtenidos a distintas condiciones de tiempo y temperatura de extracción) se determinó a 20°C.

Tabla 14. pH de los extractos azucarados de semillas de molle

N° de tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	pH promedio
1	20	15	2015	4,40 ± 0,04
2	20	30	2030	4,37 ± 0,04
3	20	45	2045	4,31 ± 0,06
4	55	15	5515	4,19 ± 0,05
5	55	30	5530	4,18 ± 0,03
6	55	45	5545	4,18 ± 0,03
7	90	15	9015	4,13 ± 0,03
8	90	30	9030	4,14 ± 0,04
9	90	45	9045	4,14 ± 0,03

En la Tabla 14 se muestra los resultados de pH de los extractos azucarados de semillas de molle donde se puede observar que el valor promedio de pH de los mostos se encuentra entre 4,13 y 4,40, estos valores son semejantes a los resultados de Paredes et. al., (1999) quienes reportan un pH de 4 en el primer día de fermentación de los extractos

Figura 16. Comportamiento promedio del pH de los extractos azucarados



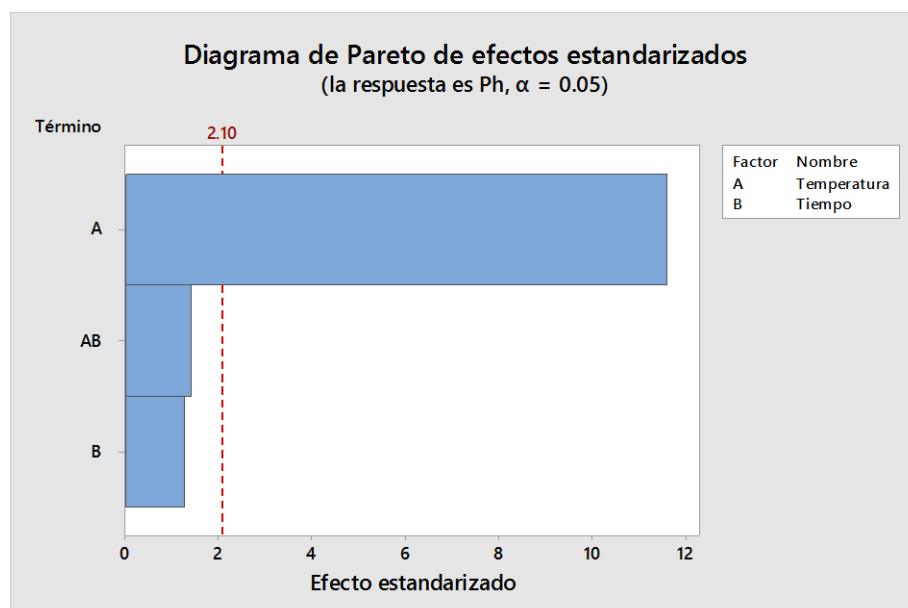
En la Figura 16 se observa la tendencia del comportamiento del pH de los extractos azucarados de semillas de molle con los 9 tratamientos de extracción, donde las extracciones de azúcar realizadas a 90°C obtuvieron menor pH en el rango de 4,13 a 4,14 mientras que los resultados de la extracción a 55 °C entre 4,18 a 4,19 y los resultados de la extracción a 20°C obtuvieron un valor entre 4,31 a 4,40.

De la Figura 16 se puede decir que el pH de los extractos tiende a disminuir a medida que la temperatura de extracción incrementa, esto se debe a que el pH es una medida de acidez o alcalinidad de una solución acuosa y las temperaturas altas dan mayor energía a las moléculas del agua y son capaces de diluir los ácidos presentes en las semillas con más facilidad que el solvente con temperatura menor, el cual hace que el pH sea menor a 7. Los resultados se contrastan con la investigación de Bustamante (2019) quien determinó que el tiempo de cocción de la malta para la obtención de chicha de jora influye en el pH de los azúcares fermentables ya que en el proceso se desdobra los nutrientes y este disminuye conforme el tiempo de cocción aumenta.

Según Oña (2019) el crecimiento de las levaduras responsables de la fermentación alcohólica no se da con normalidad a pH menores a 3,5. Los extractos azucarados de semillas de molle obtenidos tienen un pH apto para para el desarrollo de las levaduras como lo indica Oña (2019).

El pH de los extractos azucarados obtenidos con los distintos tratamientos tiene un $\Delta = 0,27$, por lo tanto, al incrementar el tiempo y temperatura de extracción no se da una variación considerable de pH.

Figura 17. Diagrama de Pareto para el pH de los extractos azucarados



El Anexo 13 del análisis de varianza y la Figura 17 muestran que el factor temperatura es estadísticamente significativo ($p = 0,00 < 0,05$) en la extracción de los azúcares fermentables, mas no el tratamiento ni el tiempo de extracción ($p > 0,05$)

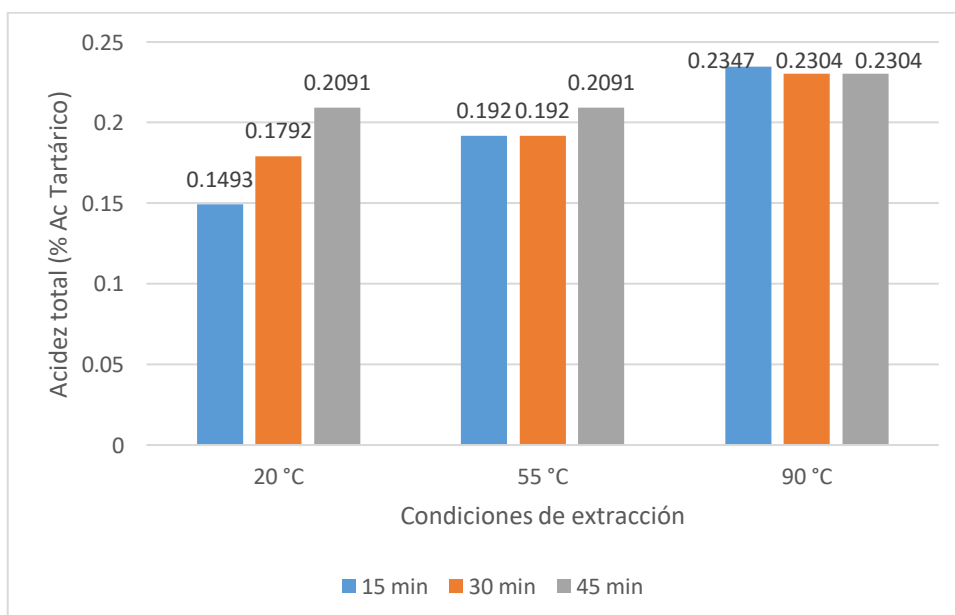
4.1.4 Análisis de acidez total de los extractos azucarados de semillas de molle

La acidez total de los extractos azucarados (obtenidos a distintas condiciones de tiempo y temperatura de extracción) se determinó a 20°C.

Tabla 15. Acidez total (exp. %Ac. Tartárico) de los extractos azucarados de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	Acidez promedio (%Ac. Tartárico)
1	20	15	2015	0,1490 ± 0,0270
2	20	30	2030	0,1792 ± 0,0680
3	20	45	2045	0,2091 ± 0,0850
4	55	15	5515	0,1920 ± 0,0340
5	55	30	5530	0,1920 ± 0,0260
6	55	45	5545	0,2091 ± 0,0150
7	90	15	9015	0,2347 ± 0,0150
8	90	30	9030	0,2304 ± 0,0130
9	90	45	9045	0,2304 ± 0,0130

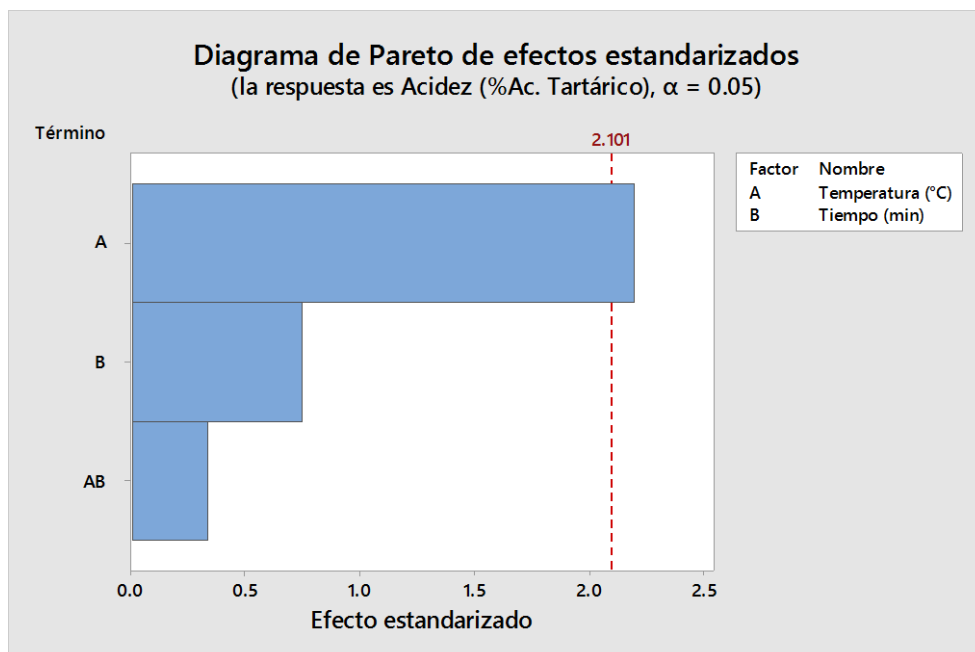
Figura 18. Comportamiento promedio de la acidez total (%Ac. Tartárico) de los extractos azucarados de semillas de molle



En la Tabla 15 se muestra que los resultados de la acidez total de los extractos azucarados expresado en porcentaje de ácido tartárico van desde 0,1493 % a 0, 2347 %. En la Figura 18 se observa que, en la extracción a 90 °C los mostos tienen un porcentaje de acidez de 0, 2304 % a 0, 2347 %, con la extracción a 55 °C tiene una acidez entre 0,192 % a 0.2091% y con la extracción realizada a 20 °C tiene una acidez entre 0,1920 % a 0,2091 %. La acidez de los extractos azucarados de semillas de molle están relacionados directamente proporcional con el tiempo y temperatura de extracción, este comportamiento se debe a que el agua a mayor temperatura presenta más energía en sus moléculas que el agua a menor temperatura y es capaz de diluir con facilidad los nutrientes (ácidos orgánicos) de las semillas de molle; por ello los mostos obtenidos a temperaturas de 55 °C y 90 °C por 45 minutos presentan mayor porcentaje de acidez que el de los mostos extraídos a 20 °C por 15 minutos. Esta explicación también lo avala Bustamante (2019) quien en su investigación sobre el tiempo de cocción de la jora para la obtención de una bebida fermentada menciona que, conforme aumenta el tiempo de cocción se produce el desdoblamiento de nutrientes mediante la acción enzimática y por ello se da la liberación de ácidos.

La acidez total de los extractos azucarados obtenidos con los distintos tratamientos tiene un $\Delta = 0,0854$ %, por lo tanto, al incrementar el tiempo y temperatura de extracción no se da una variación considerable del % acidez total.

Figura 19. Diagrama de Pareto para Acidez total (exp. %Ac. Tartárico) de los extractos azucarados de semillas de molle



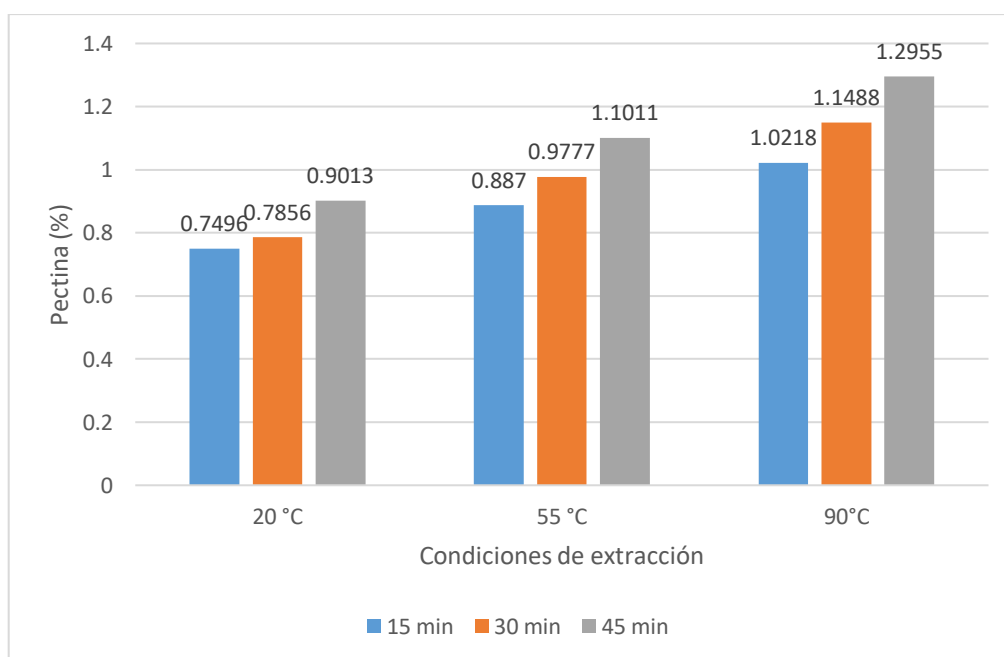
En la Figura 19 se observa que la barra A perteneciente al factor temperatura de extracción sobrepasa la línea de referencia e indica que la temperatura influye sobre el porcentaje de acidez total; de acuerdo al análisis de varianza del Anexo 14 se demuestra que este factor es estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

4.1.1. Análisis de pectina de los extractos azucarados de semillas de molle

Tabla 16. Porcentaje de pectina de los extractos azucarados de semillas de molle

N° de tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	Pectina promedio (%)
1	20	15	2015	0,749 ± 0,013
2	20	30	2030	0,785 ± 0,008
3	20	45	2045	0,901 ± 0,005
4	55	15	5515	0,887 ± 0,009
5	55	30	5530	0,978 ± 0,006
6	55	45	5545	1,101 ± 0,017
7	90	15	9015	1,022 ± 0,050
8	90	30	9030	1,148 ± 0,016
9	90	45	9045	1,292 ± 0,035

Figura 20. Comportamiento promedio del % pectina de los extractos azucarados



En la Tabla 16 y la Figura 20 se observa que el porcentaje de pectina promedio de los extractos está en un rango de 0,7496 % a 1,2925 % y varía con los distintos tratamientos. Con la extracción de los mostos de semillas de molle obtenidos a 20°C se obtuvo un porcentaje de pectina de $0,8120 \pm 0,0690$ %, a 55 °C de extracción $0,9886 \pm 0,0936$ % y a 90 °C de extracción $1,1544 \pm 0,1213$ %. El menor porcentaje de pectina se obtiene con el tratamiento a 20 °C por 15 minutos y el mayor porcentaje con el tratamiento a 90 °C por 45 minutos; se puede ver que en todos los tratamientos conforme aumenta el tiempo y temperatura de extracción incrementa el porcentaje de pectina extraído en el mosto. Este comportamiento se debe a que las pectinas son sólidos que se diluyen mejor en el agua caliente y como las sustancias pécticas de las semillas de molle se encuentran en la pared secundaria, el solvente (agua) se toma más tiempo en diluir la pectina. Por ello el porcentaje de pectina de los extractos azucarados obtenidos a mayor tiempo tienen valores superiores al de las extracciones realizadas durante 15 min. Esto concuerda con lo indicado por Bindler et. al., (2009) quienes mencionan que las sustancias pécticas de las plantas pequeñas se encuentran principalmente en mayor proporción en la pared secundaria y Lliuyacc (2018) en su investigación sobre la influencia de la temperatura en la extracción de pectinas a partir de cascaras de tumbo indica que las pectinas obtenidas con una extracción a 76°C por 56 minutos tienen un porcentaje de rendimiento de 12,99 y con la extracción realizada a una temperatura de 64°C por 56 minutos reporta un rendimiento de 8,94 %.

En el Anexo 15 del análisis de varianza se observa que el tratamiento, el factor temperatura y el factor tiempo son estadísticamente significativos sobre el % de pectina extraído en los mostos ($p < 0,05$) y ello se puede contrastar en la Figura 21 porque la barra A, AB y AB que representan a los factores y el tratamiento sobre pasan la línea de referencia.

Figura 21. Diagrama de Pareto para el % de pectina de los extractos azucarados de semillas de molle.

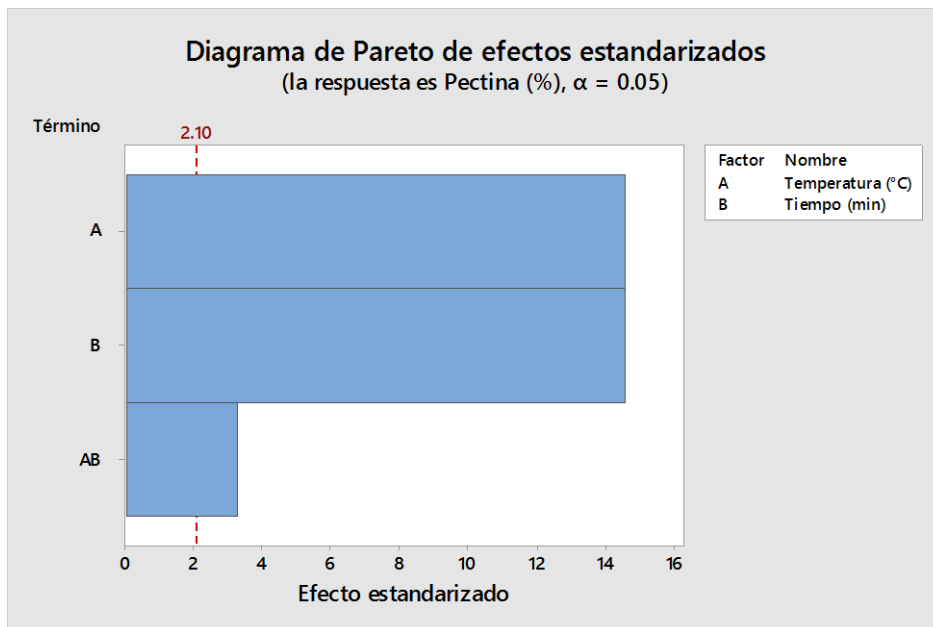
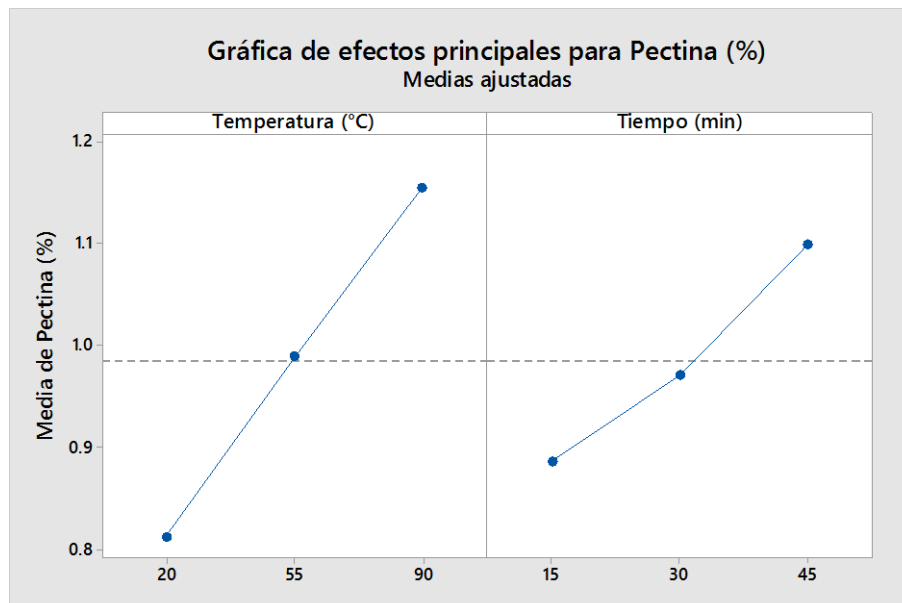


Figura 22. Gráfica de efectos principales para el % pectina de los extractos azucarados de semillas de molle.



En la Figura 22 se muestra el comportamiento lineal de las medias del porcentaje de pectina extraído en los extractos azucarados de semillas de molle y se puede decir que conforme la temperatura y tiempo de extracción incrementa el valor medio del porcentaje de pectina extraído en el mosto también se incrementa por ello tienen el comportamiento gráfico de las pendientes similar.

4.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DURANTE LA FERMENTACIÓN DE LOS EXTRACTOS AZUCARADOS DE SEMILLAS DE MOLLE

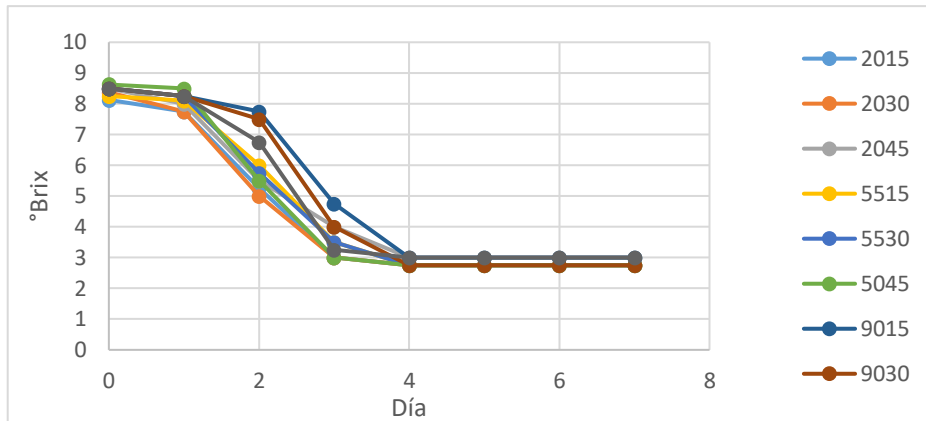
La fermentación alcohólica de los extractos azucarados de semillas de molle con códigos (2015, 2030, 2045, 5515, 5530, 5545, 9015, 9030 y 9045) se realizó a temperatura de ambiente por 7 días y se evaluó los parámetros que se muestran a continuación.

4.2.1 Evaluación de sólidos solubles (°Brix)

En la Figura 23 se puede observar que durante la fermentación existe disminución de los °Brix desde un promedio de 8,5 hasta 3 °Brix debido a que las levaduras utilizan los azúcares como sustrato para la producción de etanol. A partir del día 1 hasta el día 3 el descenso de los °Brix es mayor debido a que son los días donde hay más actividad fermentativa. Según Paredes et. al., (1999) durante la fermentación de la chicha de molle, los °Brix también disminuyen durante 7 días de fermentación desde 15 hasta 5 °Brix, pero estos valores no son iguales a los resultados de la presente investigación debido a que dichos autores no detallan la relación de azúcar: agua utilizados para la obtención del mosto, pero se puede observar en la Tabla 6 que si tienen la misma tendencia.

Se observa que la fermentación de los extractos azucarados obtenidos a 90 °C son los que se demoraron en iniciar la fermentación; la presencia de taninos y aceites esenciales hidrosolubles extraídos a altas temperaturas serían los responsables de dicha reacción. Dellacassa (2010) y Maldonado (1920) informan que en los frutos de molle se encontraron taninos y Oña (2020) menciona que los taninos son inhibidores del crecimiento de las levaduras.

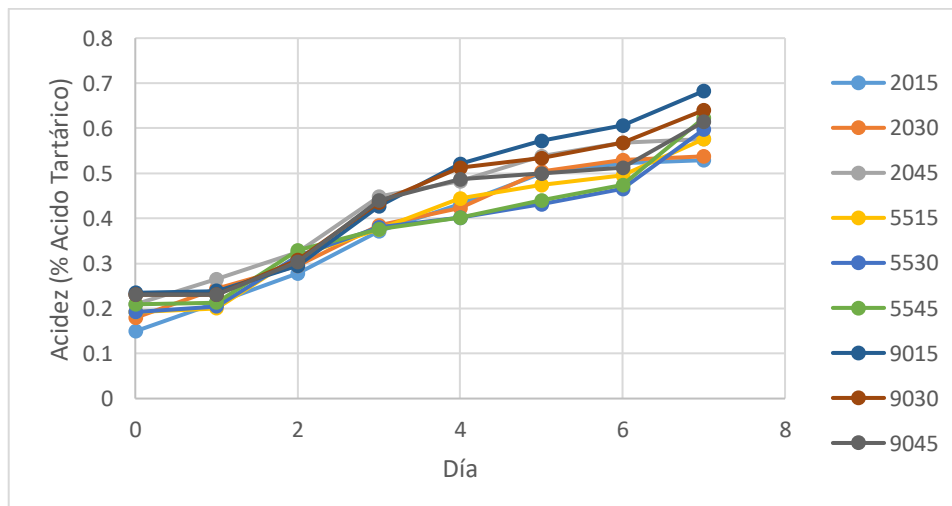
Figura 23. Comportamiento de los °Brix durante la fermentación de los extractos azucarados



4.2.2 Control de acidez

La acidez total de las bebidas fermentadas tiene un comportamiento inverso al del pH y esta va aumentando conforme pasan los días de fermentación, la tendencia del comportamiento de la acidez total se observa en la Figura 24. La acidez inicia entre 0,1493 % y 0,2304 % de ácido tartárico y finaliza después de los 7 días de fermentación entre 0,448 % y 0.5717% de ácido tartárico. El incremento de acidez durante la fermentación se debe a que los nutrientes presentes en el mosto son desdoblados por acción de las enzimas y esto conduce a la liberación de ácidos. La fermentación alcohólica tiene una reacción acida por la generación de ácidos (málico, tartárico y succínico). Según Paredes, Flores y Jordán (1999) durante la fermentación de la chicha de molle la acidez también se incrementa de en 0,11 % de ac. Tartárico hasta 0,39 % ac. Tartárico.

Figura 24. Comportamiento de la acidez total durante la fermentación de los extractos azucarados

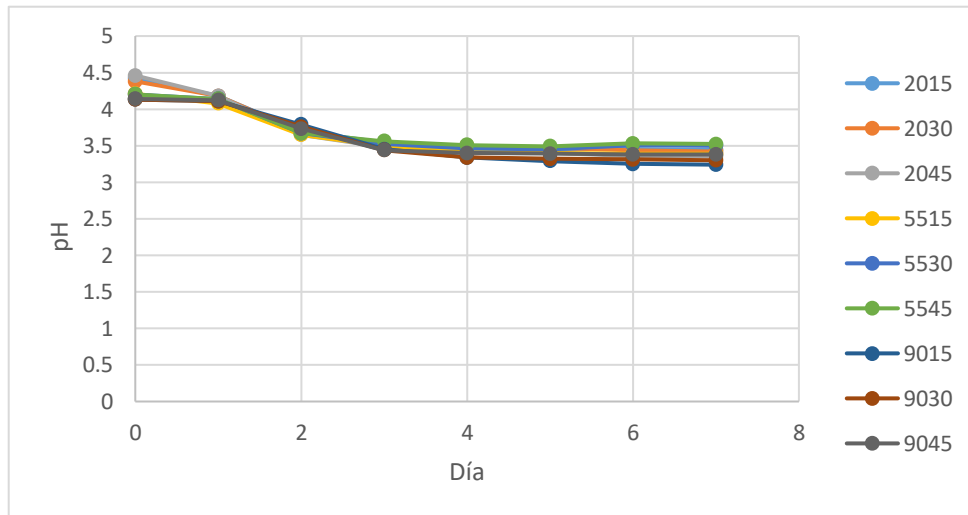


4.2.3 Evaluación de PH

En la Figura 25 se puede observar que los pH de los mostos en fermentación tienden a disminuir aceleradamente durante los tres primeros días, tal y como sucede en la concentración de azúcares, esta reacción se debe a que las levaduras por debajo del pH 3,5 las levaduras no se reproducen con facilidad. Iza (2011) menciona que el pH óptimo para la vida de las levaduras es de 3,5 a 3,8.

La tendencia del comportamiento del pH de los mostos de fruto de molle es de en el primer día de fermentación $4,13 \pm 0,05$ y en el último día de fermentación presenta un pH de $3,34 \pm 0,06$ en esto se asemeja a lo indicado por Paredes et. al, (2019) quienes indican que el pH de la bebida fermentada se reduce desde 4,00 hasta 3,30 durante los 7 días de fermentación. Bustamante (2019) afirma que durante la fermentación de la chicha de jora el pH desciende de 4,95 a 3,42 y de igual manera Iza (2011) quien informa que durante la fermentación de una bebida de zanahoria y naranja el "pH inicial comprendido entre 4,12 - 4,17 y disminuyó a un valor comprendido entre 3,26 - 3,66" (p. 63).

Figura 25. Comportamiento del pH durante la fermentación de los extractos azucarados obtenidos a distintas condiciones.



4.2.4 Evaluación de temperatura de fermentación

La temperatura de los extractos azucarados se registró introduciendo a la botella un termómetro digital previamente desinfectado con alcohol de 96 °C

Tabla 17. Temperatura de los extractos azucarados en fermentación

Día	Temperatura de fermentación (°C)
0	23,4
1	23,4
2	23,9
3	23,6
4	23,5
5	23,0
6	23,2
7	23,3

En la Tabla 17 se observa que la temperatura del mosto en fermentación está entre 23,3 y 23,9 °C no supera el rango de 33 y 35 °C temperatura en el cual Ibarra (2006) y Arango (2013) indica que la fermentación corre el riesgo de contaminación bacteriana y genera productos secundarios. La temperatura de fermentación de los extractos azucarados se encuentra por debajo de los 25 °C temperatura ideal para dar un producto apto para el consumo humano (Iza, 2011).

4.3 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y ESTADÍSTICO DE LA BEBIDA FERMENTADA DE SEMILLAS DE MOLLE

4.3.1 Análisis de densidad de la bebida fermentada de semillas de molle fermentados

Tabla 18. Densidad (g/ml) a 20°C de la bebida fermentada de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	Densidad promedio (g/ml)
1	20	15	2015	0,998 ± 0,001
2	20	30	2030	0,998 ± 0,001
3	20	45	2045	0,999 ± 0,000
4	55	15	5515	0,998 ± 0,000
5	55	30	5530	0,999 ± 0,001
6	55	45	5545	0,999 ± 0,000
7	90	15	9015	0,999 ± 0,000
8	90	30	9030	0,998 ± 0,000
9	90	45	9045	0,999 ± 0,000

En la Tabla 18 se ve que las densidades de las bebidas fermentadas están entre 0,998 y 0.999, valores menores al de la densidad del agua el cual indica que la fermentación llegó a su final, debido a la presencia de alcoholes.

En el análisis de varianza del Anexo 16 se ve que los tratamientos realizados en los extractos azucarados no influyen significativamente ($p > 0,05$) en la densidad final de las bebidas fermentadas.

4.3.2 Análisis del pH de la bebida fermentada de semillas de molle

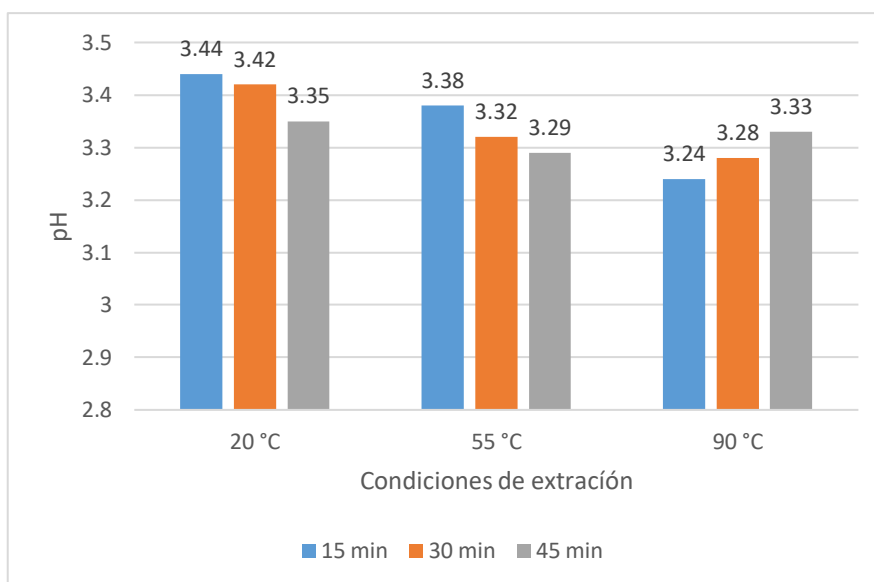
En la Tabla 19 se observa que las bebidas fermentadas a partir de los extractos azucarados obtenidos tienen un pH entre 3,24 y 3,44. Con los extractos obtenidos a 20 °C se obtuvo una bebida fermentada con pH de $3,40 \pm 0,04$, con el mosto extraído a 55°C se obtuvo una bebida fermentada con pH de $3,33 \pm 0,04$ y con el mosto extraído a 90°C se obtuvo una bebida fermentada con un pH de $3,28 \pm 0,04$. Los resultados de pH de las bebidas fermentadas de semillas de molle se asemejan al pH de la bebida obtenida por Paredes et. al., (1999) quienes en su estudio obtuvieron una chicha de molle con un pH de 3,3.

Las bebidas fermentadas de semillas de molle tienen un porcentaje de alcohol similar al de la cerveza y los resultados de pH de las muestras se encuentran dentro de los límites establecidos por NTON 03 038 (2002) para la cerveza (3,0 -4,8)

Tabla 19. pH de la bebida fermentada de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	pH promedio
1	20	15	2015	3,44 ± 0,01
2	20	30	2030	3,42 ± 0,02
3	20	45	2045	3,35 ± 0,00
4	55	15	5515	3,37 ± 0,15
5	55	30	5530	3,32± 0,01
6	55	45	5545	3,29 ± 0,02
7	90	15	9015	3,24 ± 0,03
8	90	30	9030	3,28 ± 0,02
9	90	45	9045	3,33 ± 0,02

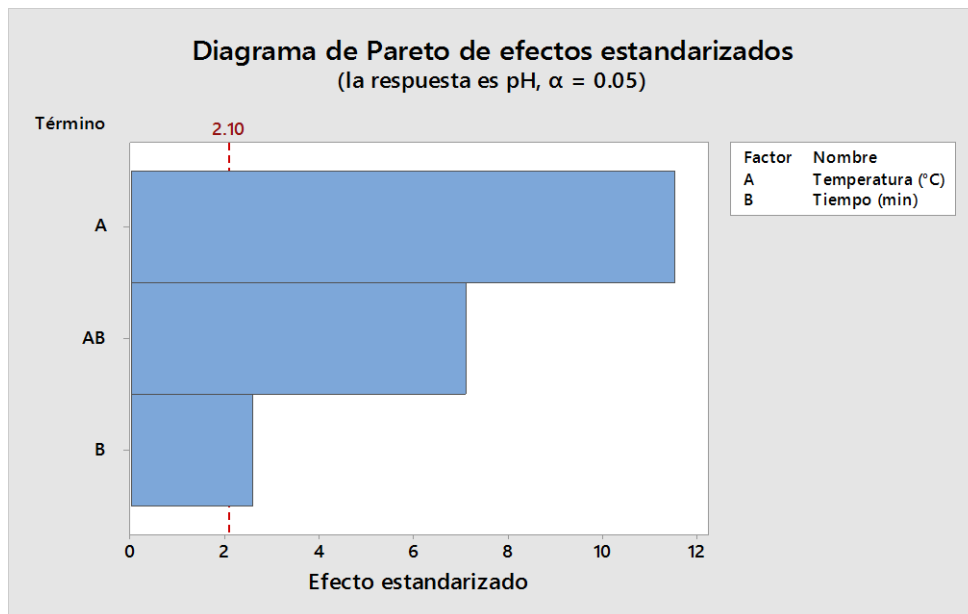
Figura 26. Comportamiento promedio del pH de la bebida fermentada de semillas de molle



El Anexo 17 del análisis de varianza indica que los tratamientos realizados en el mosto influyen de manera significativamente sobre el pH de la bebida fermentada y se puede observar en la Figura 26 que con la extracción de los mostos a 20°C el pH de las bebidas fermentadas tiene un valor máximo el que se obtuvo del mosto extraído por 15 minutos

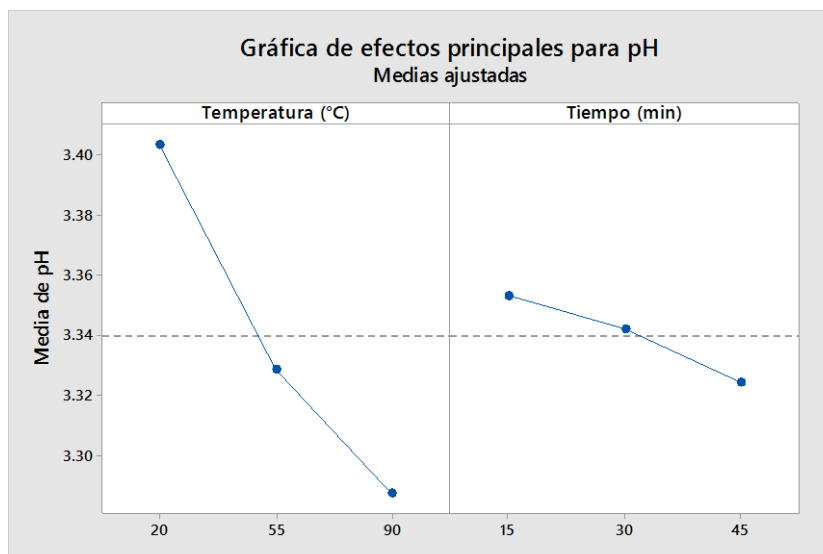
(3,44) , tiene un valor intermedio el extraído por 30 min (3,42) y un valor mínimo de pH la bebida fermentada a partir del extracto obtenido a 45 min (3,35); esta misma relación de tiempo y pH se presentó en los resultados de caracterización de los mostos tratados a 20°C (Figura16) . En el caso de los resultados de pH de las bebidas obtenidas con las extracciones de mostos a 55 y 90 °C durante 15 min tienen un valor mínimo de pH (3,37 y 3,24); un valor intermedio de pH con el mosto extraído por 30 min (3,44 y 3,3) y tienen un pH máximo las bebidas fermentadas de los extractos obtenidos por 45 min (3,49 y 3,38).

Figura 27. Diagrama de Pareto para pH la bebida fermentada de semillas de molle



En el Anexo 17 se muestra el análisis de varianza y se observa que los factores (tiempo y temperatura de extracción) y el tratamiento influye significativamente en el pH de la bebida fermentada ($p < 0,05$) .La Figura 27 del diagrama de Pareto describe el análisis de varianza, se observa que las barras que representan al factor temperatura, tiempo y la combinación de temperatura- tiempo pasan la línea de referencia, esto indica que el tratamiento realizado en la extracción del mosto tiene un efecto significativo sobre el pH de las bebidas fermentadas.

Figura 28. Gráfica de efectos principales para el pH la bebida fermentada de semillas de molle



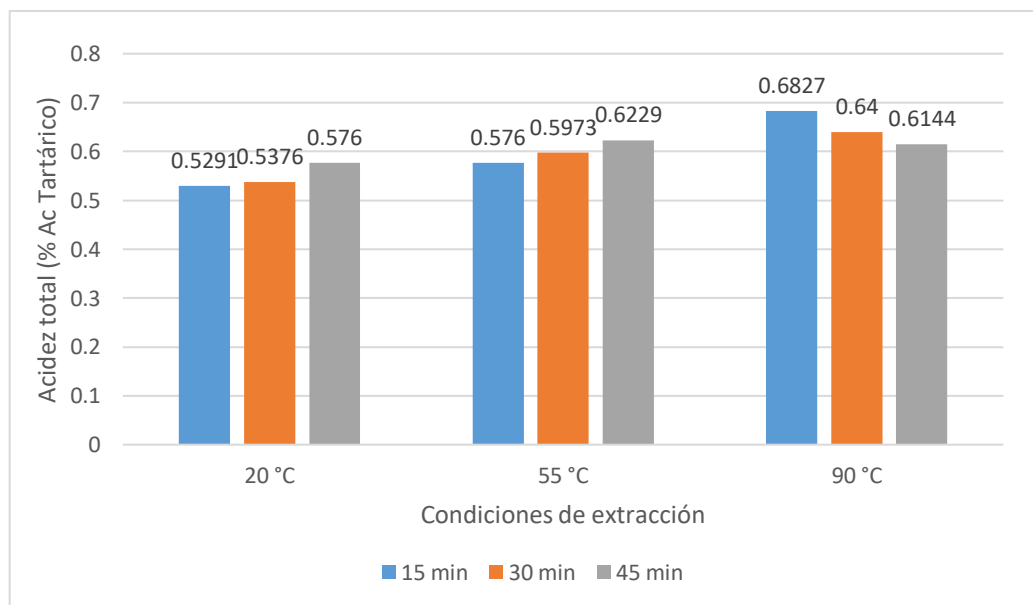
En la Figura 28 se observa que las medias de los resultados de pH en los tratamientos de los mostos a 90°C presentan un pH promedio de 3,28 en la bebida fermentada, seguido de las bebidas fermentadas a partir de extractos obtenidos a 55 °C presentan un pH promedio de 3,33 y por ultimo las bebidas fermentadas a partir de extractos obtenidos a 90°C presentan un pH de 3,40 superior al de las otras bebidas. En cuanto al tiempo se observa que las medias de los resultados de pH de las bebidas fermentadas a partir de extractos obtenidos a 20 °C, 50 °C y 90 °C durante 15 min presenta un pH mayor y este valor va disminuyendo con el tiempo de extracción.

4.3.3 Análisis de acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle

Tabla 20. Acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	Acidez promedio (% Ac. Tartárico)
1	20	15	2015	0,5290 ± 0,019
2	20	30	2030	0,5370 ± 0,013
3	20	45	2045	0,5760 ± 0,0000
4	55	15	5515	0,5760 ± 0,0128
5	55	30	5530	0,5973 ± 0,0073
6	55	45	5545	0,6229 ± 0,0073
7	90	15	9015	0,6827 ± 0,0073
8	90	30	9030	0,6400 ± 0,0128
9	90	45	9045	0,6144 ± 0,0128

Figura 29. Comportamiento promedio de la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle

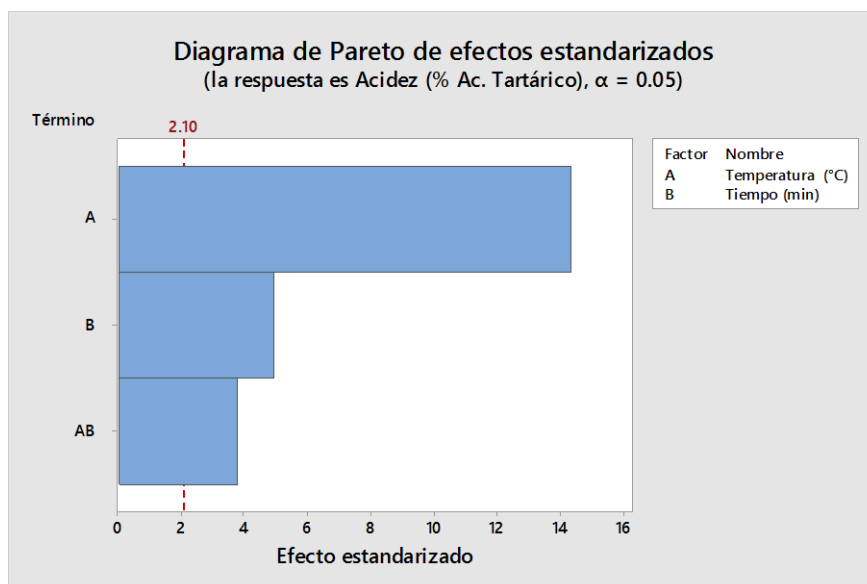


En la Tabla 20 los resultados de la fermentación de los mostos extraídos con los distintos tratamientos tienen una acidez total promedio entre 0,5163 % a 0,6272 % expresados en porcentaje de ácido tartárico.

Las bebidas fermentadas a partir de los extractos azucarados obtenidos a 20°C presentan una acidez de $0,5404 \pm 0,0254$ % exp. Ac. Tartárico, las bebidas a partir de los extractos obtenidos a 55 °C una acidez de $0,5873 \pm 0,0186$ % exp. Ac. Tartárico y las bebidas fermentadas a partir de los extractos obtenidos a 90°C una acidez de $0,6200 \pm 0,0112$ % exp. Ac. Tartárico. Los valores de acidez total obtenidos son superiores a los resultados obtenidos por Paredes et. al., (1999) quienes reportan 0,37 % de acidez total de una chicha de molle obtenida con un mosto de 10 °Brix; 0,35% de acidez total de una chicha con un mosto al que se le añadió azúcar e inicio con 12 °Brix del cual se puede detallar que la concentración de azúcares presente en el mosto inicial es uno de los factores que influye en el % de acidez total de los fermentos por ello la diferencia. Según Paredes et. al., (1999) la chicha de molle presenta menos acidez que el vino de mandarina (0,74%) y la chicha de jora (1,23%) este enunciado concuerda con los resultados obtenidos.

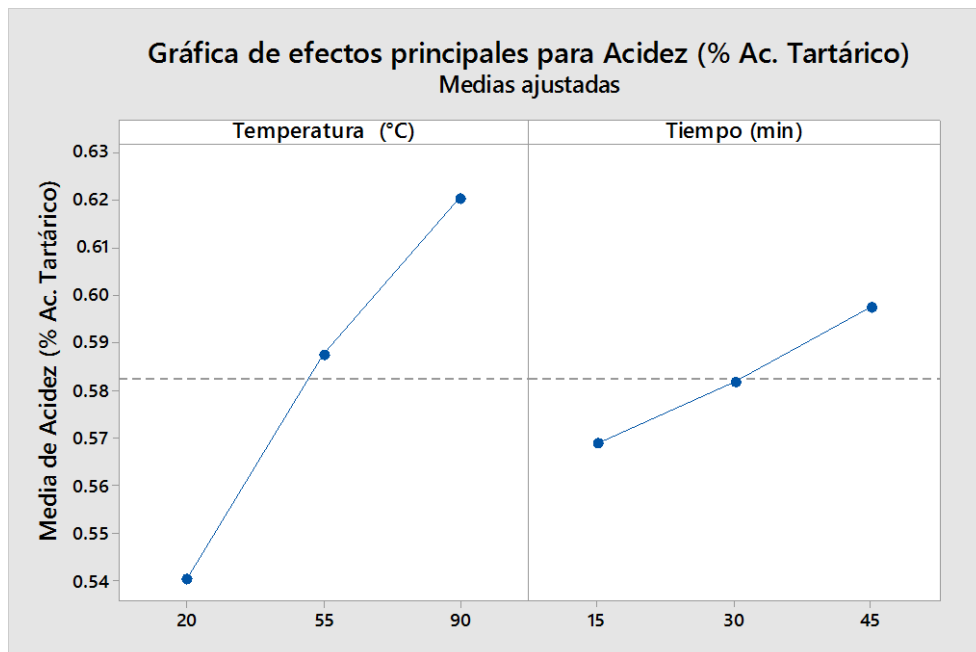
En la figura 29 se observa que las bebidas fermentadas de semillas de molle obtenidas con el mosto extraído a 90 °C por 15 minutos presentan mayor acidez total (0,6186 % exp. Ac. Tartárico). Sin embargo, los valores de acidez total de las bebidas fermentadas de los extractos azucarados de semillas de molle están dentro de los límites permitidos por la NTP 212.014.2011 “Bebidas alcohólicas vitivinícolas. Vinos. Requisitos” y NTP 210.026.2007 “Bebidas alcohólicas. Sidra. Requisitos” la acidez total como mínima en vino es de 3 g/L y máximo 7 g/L y para la sidra va de 4 g/L a 8 g/L; estos resultados garantizan que son aptos para su consumo.

Figura 30. Diagrama de Pareto para la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle



En el Anexo 18 del análisis de varianza se muestra que el tratamiento, el factor temperatura y el factor tiempo son estadísticamente significativos sobre el contenido de acidez total de las bebidas fermentadas ($p < 0,05$) y ello se puede contrastar en la Figura 30 debido a que la barra A, AB y AB que representan a los factores y el tratamiento sobre pasan la línea de referencia.

Figura 31. Gráfica de efectos principales para la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle



En la Figura 31 se muestra que la acidez total media de las bebidas fermentadas a partir de los extractos azucarados obtenidos a 20 °C ,55 °C y 90 °C presentan una acidez de 0,54 % exp Ac. Tartárico,0,58 % exp Ac. Tartárico y 0,62 % exp Ac. Tartárico, respectivamente. La acidez media de las bebidas con mostos extraídos durante 15 min presenta 0,57 % exp Ac. Tartárico, las bebidas obtenidas a partir de mostos extraídos por 30 min tienen una acidez de 0,58 % exp Ac. Tartárico y las bebidas obtenidas a partir de los mostos extraídos a 90°C tienen una acidez total de 0,60 % exp Ac. Tartárico.

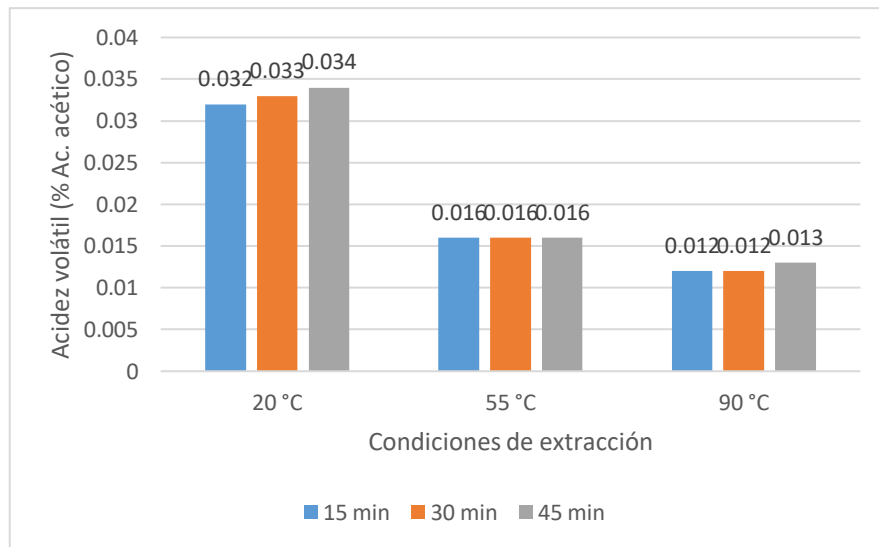
4.3.4 Análisis de acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle

Tabla 21. Acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	Acidez Volátil promedio (exp. %Ac. Acético)
1	20	15	2015	0,032 ± 0,003
2	20	30	2030	0,033 ± 0,001
3	20	45	2045	0,034 ± 0,000
4	55	15	5515	0,016 ± 0,001
5	55	30	5530	0,016 ± 0,001
6	55	45	5545	0,016 ± 0,001
7	90	15	9015	0,012 ± 0,000
8	90	30	9030	0,012 ± 0,002
9	90	45	9045	0,013 ± 0,003

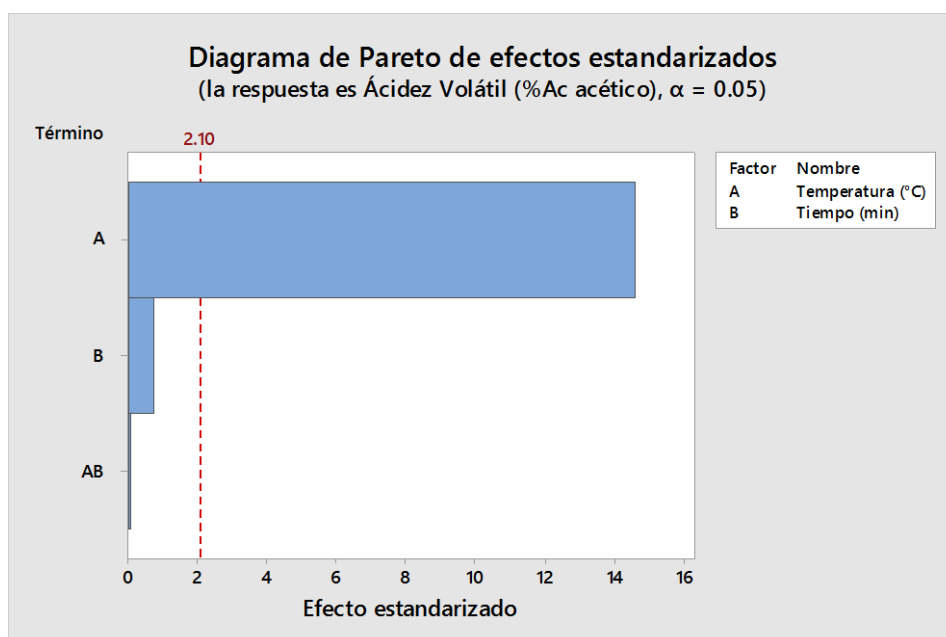
En la Tabla 21 se muestra los resultados de la acidez volátil de las bebidas fermentadas a partir de los extractos azucarados sometidos a los tratamientos detallados en la misma tabla, se obtuvo un valor de 0,012 % a 0,034% o 0,12 g/L a 0,34 g/L Ac. acético. Las bebidas fermentadas de semillas de molle obtenidas a partir del extracto azucarado obtenidos a 20°C presentan una acidez volátil mayor al de las bebidas obtenidas con los mostos extraídos a 55°C y 90°C, esto se debe a que esta bebida se elaboró con un extracto que no recibió tratamiento térmico y hubo mayor desarrollo de las bacterias acéticas. Sin embargo la acidez volátil de todas las bebidas obtenidas a partir de extractos azucarados obtenidos a 20°C, 55°C y 90°C se encuentran dentro de los límites establecidos para vinos y sidra en la NTP212.014 (2016) y la NTP 210.026 (2019) que indican que el límite máximo permitido es de 1,2 g/L ó 0,12 % Ac. Acético. No hay reportes de la acidez volátil de la chicha de molle, pero sí de las muestras de chicha de jora recolectada por García y Mamani (2008) quienes reportan una acidez volátil de 0,9 a 4,7 g/L Ac. Acético, estos valores son superiores al de los resultados obtenidos en las bebidas fermentadas de semillas de molle.

Figura 32. Comportamiento promedio de la acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle



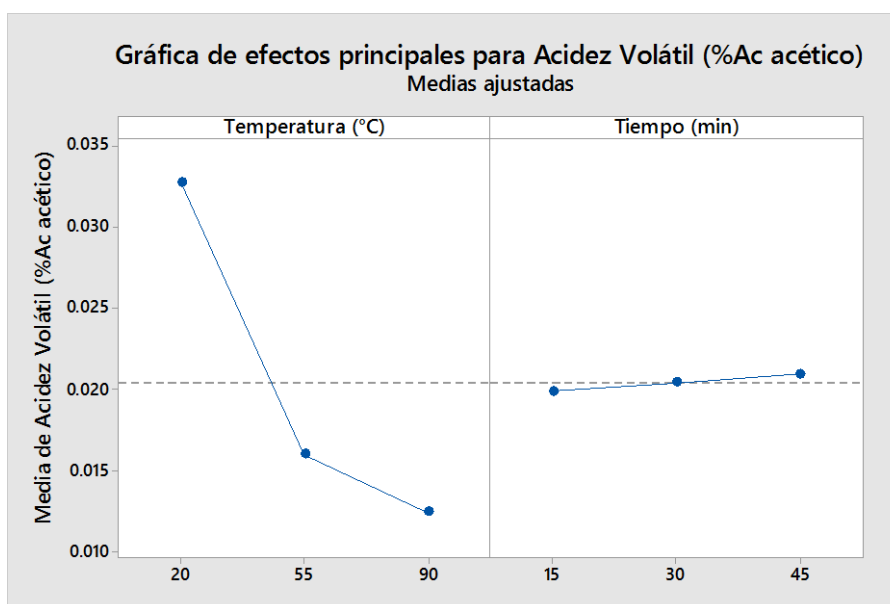
En la Figura 32 también se observa que las bebidas fermentadas obtenidas a partir de extractos azucarados obtenidos a 20°C presentan mayor acidez volátil entre 0,032 a 0,034 % de ácido acético y las bebidas obtenidas con extractos a 90 °C son las que tienen menor porcentaje de acidez entre 0,012 a 0.013 % de ácido acético y las bebidas obtenidas de los mostos tratados a 20 °C son los que presentan mayor acidez volátil entre 0,032% a 0,034%.

Figura 33. Diagrama de Pareto para la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle



De acuerdo al análisis de varianza del Anexo 19 se observa que solo el factor temperatura de extracción de los mostos influye significativamente en el contenido de acidez volátil de las bebidas fermentadas ($p < 0,05$) y ello se puede contrastar en la Figura 33 debido a que la barra representativa del factor temperatura sobre pasa la línea de referencia.

Figura 34. Gráfica de efectos principales para la acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle



En la Figura 34 se muestra que la acidez volátil media de las bebidas fermentadas a partir de los extractos azucarados obtenidos a 20 °C es la mayor y este valor disminuye en las extracciones de 55 y 90°C; en la gráfica del factor tiempo se observa que las medias de los resultados de acidez volátil de las bebidas fermentadas con mostos extraídos a 20,50 y 90 °C aumenta con el tiempo de extracción, pero esta esta variación es mínima.

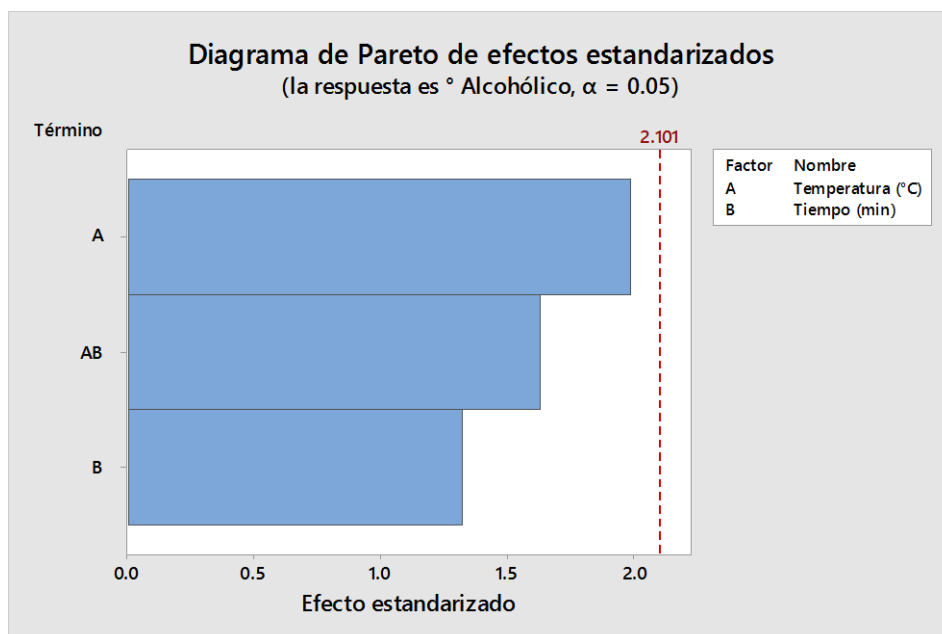
4.1.2. Análisis de etanol de la bebida fermentada de semillas de molle

La Tabla 22 muestra los resultados del análisis de etanol expresado en porcentaje en el cual no se observa una gran variación entre los tratamientos y se tiene un promedio de 3% de etanol. Paredes et. al., (1999) obtuvieron una chicha de molle con 4% alcohol este resultado se aproxima a lo obtenido en la presente investigación.

Tabla 22. Grados alcohólicos de la bebida fermentada de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Código	° Alcohólico Promedio
1	20	15	2015	2,9 ± 0,05
2	20	30	2030	3,0 ± 0,00
3	20	45	2045	3,0 ± 0,00
4	55	15	5515	2,9 ± 0,05
5	55	30	5530	3,0 ± 0,05
6	55	45	5545	3,0 ± 0,00
7	90	15	9015	3,0 ± 0,06
8	90	30	9030	3,0 ± 0,00
9	90	45	9045	3,0 ± 0,00

Figura 35. Diagrama de Pareto para el grado alcohólico de la bebida fermentada de semillas de molle



En la Figura 35 se observa que las barras que representan a los factores y a los tratamientos no superan el límite establecido en el diagrama de Pareto por lo tanto la temperatura, el tiempo y los tratamientos no influyen en los grados alcohólicos de la bebida fermentada a partir de los extractos azucarados; lo mismo se puede observar en el

análisis de varianza del Anexo 20 donde la temperatura , el tiempo y la iteración de ambos nos son estadísticamente significativos ($p>0,05$) sobre los grados alcohólicos.

4.3.5 Análisis de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle

Figura 36. Espectro ampliado de la bebida fermentada de código 2015

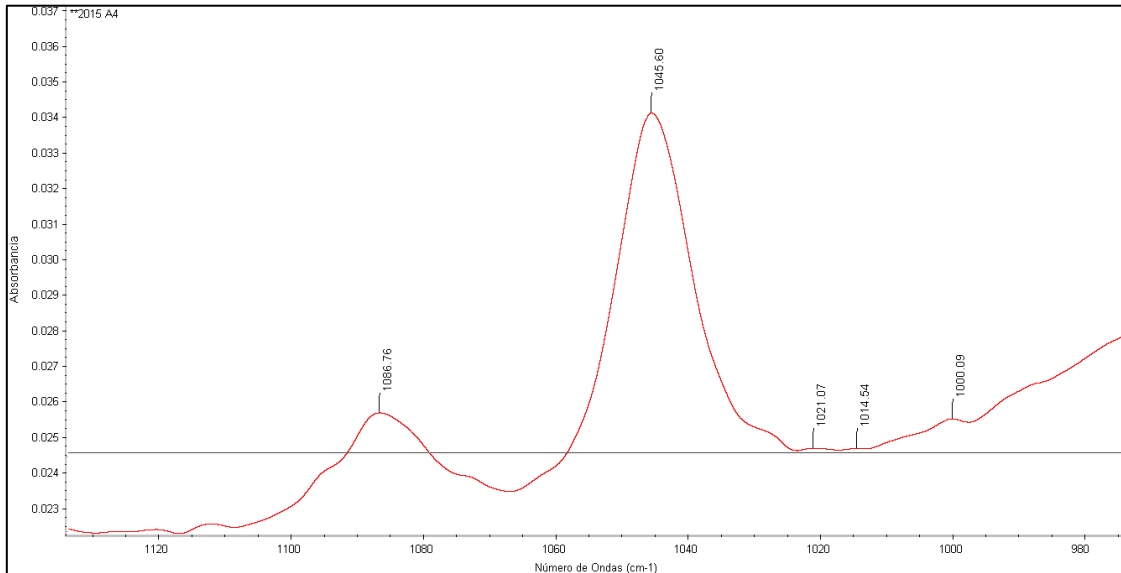
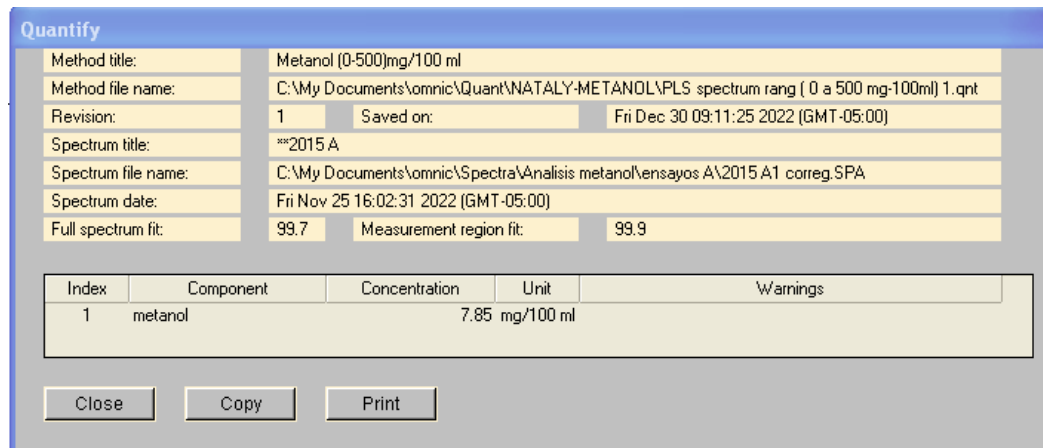


Figura 37. Cuantificación de metanol de la bebida fermentada de código 2015



En la Figura 36 la absorbancia de la bebida fermentada a partir del extracto obtenido a 20°C y 15 min (2015A) muestra un valor de 0,02460 en el pico 1021,07 cm^{-1} que representa a la vibración correspondiente al metanol y en la Figura 37 se observa que el contenido de metanol de una de las repeticiones es 7,95 mg/100 ml de muestra.

Figura 38. Espectro ampliado de la bebida fermentada de código 5515

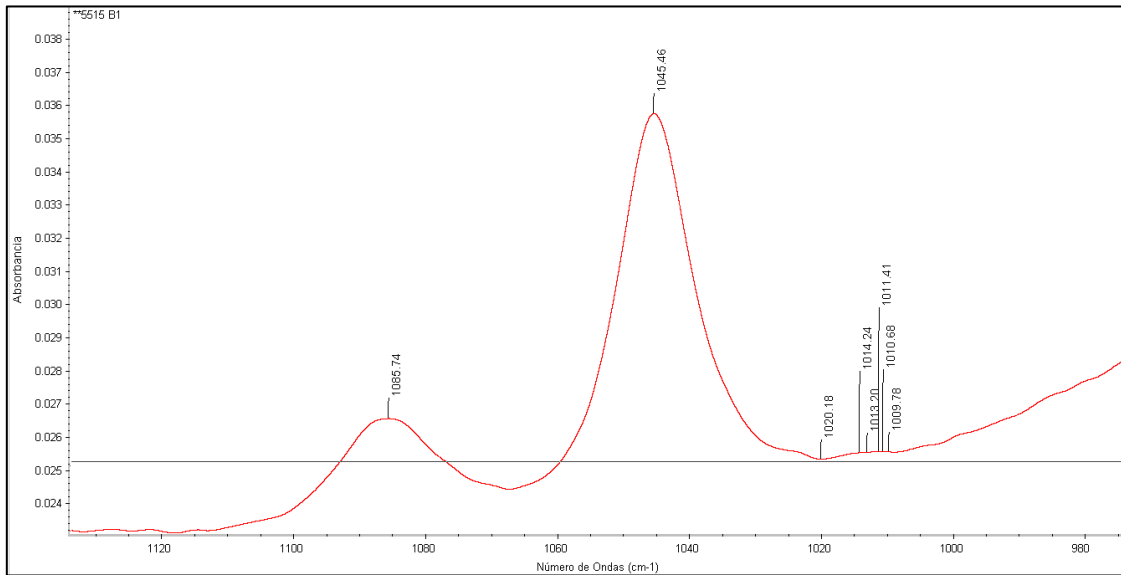
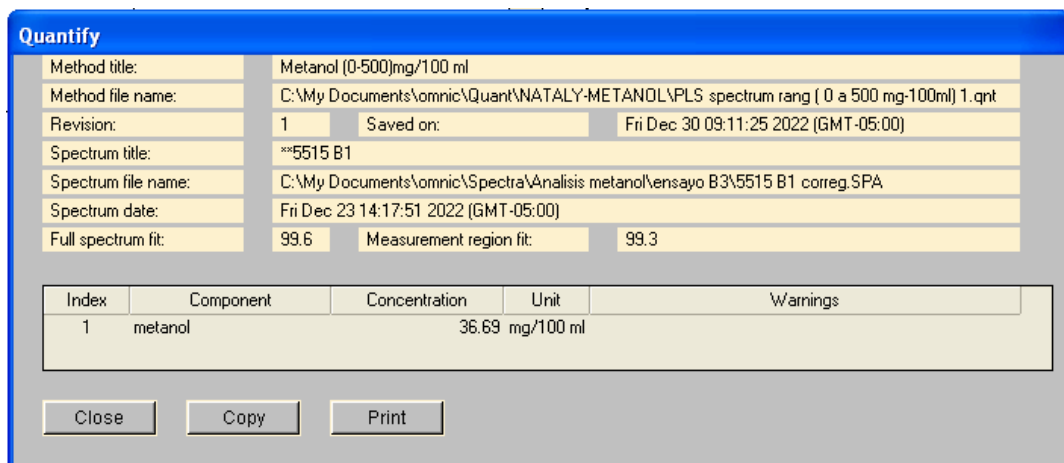


Figura 39. Cuantificación de metanol de la bebida fermentada de código 5515



En la Figura 38 la absorbancia de la bebida fermentada a partir del extracto obtenido a 55°C por 15 min (5515B) muestra un valor de 0,02530 en el pico 1020,18 cm⁻¹ que representa a la vibración correspondiente al metanol y en la Figura 39 se observa que el contenido de metanol de una de las repeticiones es 36,69 mg/100 ml de muestra.

Figura 40 . Espectro ampliado de la bebida fermentada de código 9045

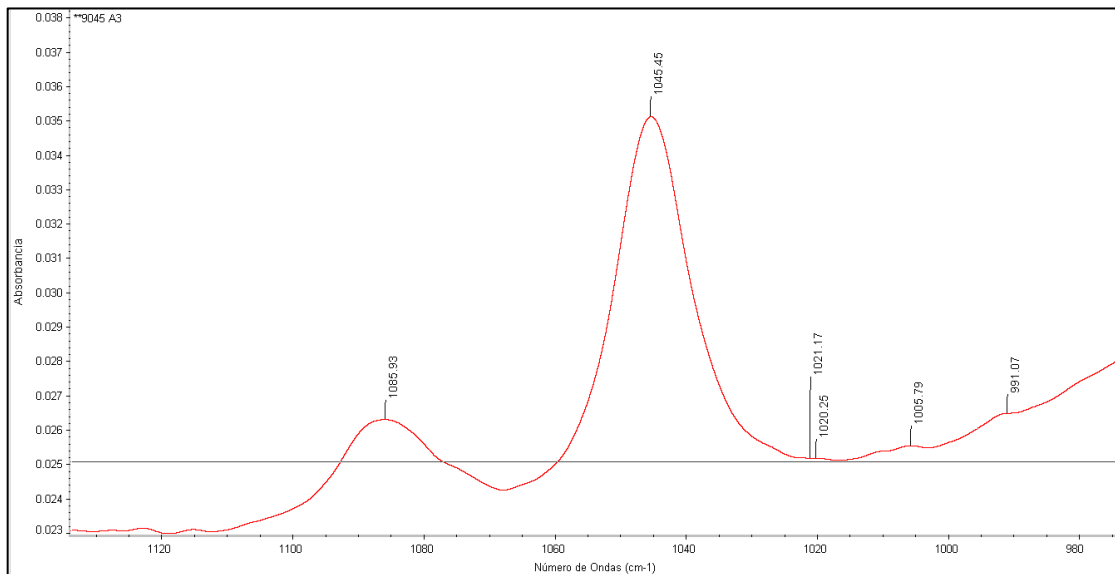
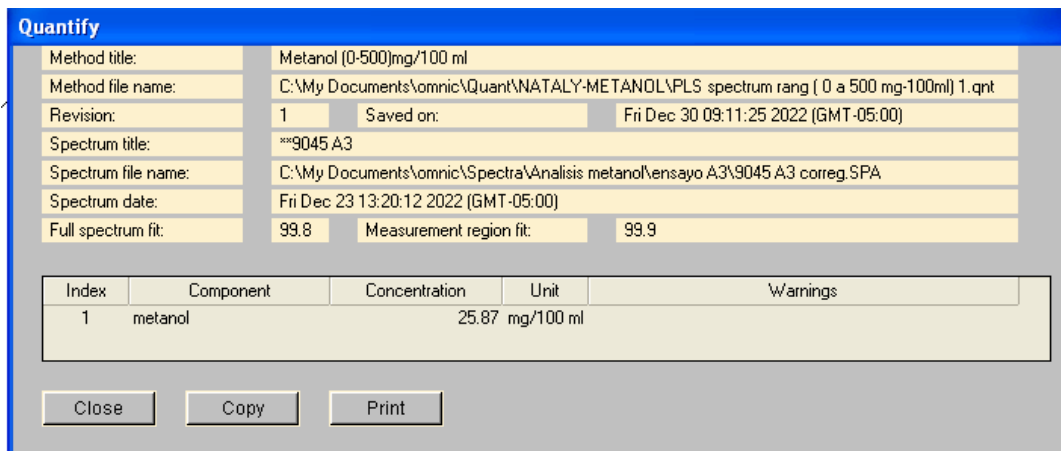


Figura 41. Cuantificación de metanol de la bebida fermentada de código 9045

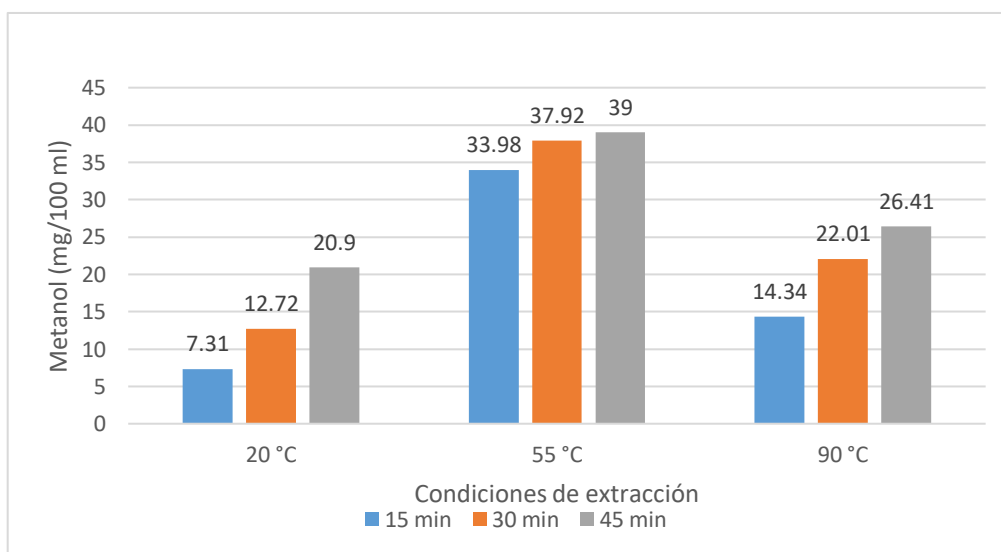


En la Figura 40 la absorbancia de la bebida fermentada a partir del extracto obtenido a 90°C y 45 min (9045) muestra un valor de 0,02510 en el pico 1020,25 cm⁻¹ que representa a la vibración correspondiente al metanol y en la Figura 41 se observa que el contenido de metanol de una de las repeticiones es 25,87 mg/100 ml de muestra.

Tabla 23. Contenido de metanol en la bebida fermentada de semillas de molle

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Metanol promedio (mg/100 ml)
1	20	15	7,31 ± 0,16
2	20	30	12,72 ± 1,11
3	20	45	20,90 ± 0,88
4	55	15	33,98 ± 2,40
5	55	30	37,92 ± 0,24
6	55	45	39,00 ± 0,50
7	90	15	14,34 ± 0,29
8	90	30	22,01 ± 0,87
9	90	45	26,41 ± 0,77

Figura 42. Comportamiento promedio de metanol en las bebidas fermentadas de semillas de molle



En la Figura 42 se observa que el contenido de metanol se incrementa conforme el tiempo de extracción aumenta y que las bebidas a partir de mostos extraídos a 55°C tienen mayor contenido de metanol.

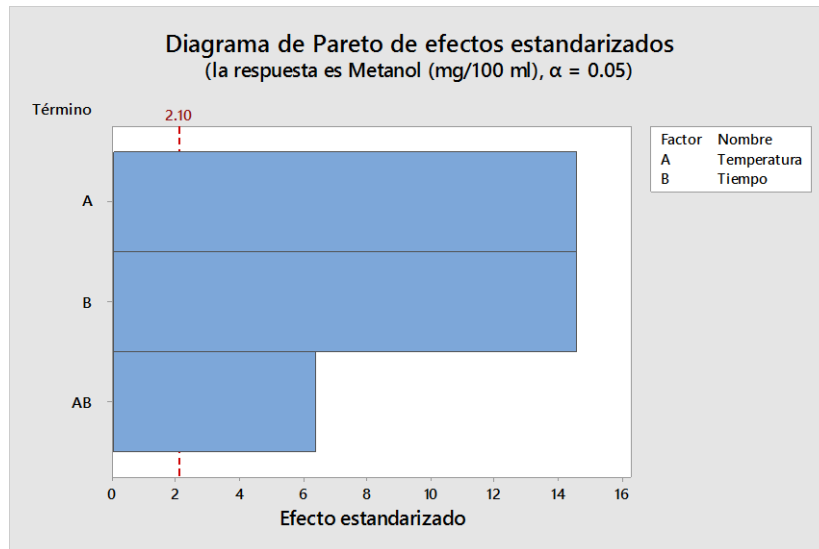
En la Tabla 23 se detalla los resultados del contenido de metanol de las bebidas fermentadas en mg/100 ml de muestra, se obtuvo una concentración de metanol entre 7,31 a 39 mg/100 ml el cual varía debido a que las condiciones de obtención de los

azúcares fermentables fueron distintas. Las bebidas fermentadas obtenidas a partir de los mostos extraídos a 20°C presentaron valores de metanol entre 7,31 a 20,90 mg/100 ml de muestra; las bebidas fermentadas obtenidas a partir de los mostos extraídos a 55°C presentaron valores entre 33,98 mg/100 ml a 37,92 mg/100 ml de muestra y las bebidas obtenidas a partir de mostos extraídos a 90°C presentan valores de metanol entre 14,34 mg/100 ml a 26,41 mg/100 ml de muestra. Las bebidas fermentadas a partir de los extractos azucarados obtenidos a 55 °C superan considerablemente en el contenido de metanol a las bebidas que se obtuvieron con mostos extraídos a 20 y 90 °C. Esto se debe a que a temperaturas entre 55°C y 60°C la enzima pectina metil esterasa (responsable de la generación de metanol) presenta una actividad óptima (Chaiyasut et. al. 2013).

Las bebidas fermentadas a partir de los mostos extraídos a 90°C presentan concentraciones de metanol semejantes al de las bebidas obtenidas con mostos extraídos a 20 °C. Carbonell et. al., (1990) indican que entre 85 y 90 °C por 15 min se inactiva la pectina metilesterasa; este tratamiento debió generar cantidades menores de metanol en las bebidas fermentadas (obtenidas a partir de mostos extraídos a 90°C) que las bebidas fermentadas (obtenidas a partir de mostos extraídos a 20°C) porque se inactivó las enzimas propias de la materia prima. Sin embargo, los resultados de los porcentajes de pectina en los mostos obtenidos a 90°C (Tabla 16) son superiores al de los mostos obtenidos a 20°C, factor que también influye en la generación de metanol como indican Blinder et. al., (2009) , Botelho et al. (2020) y Ohimain (2016) quienes mencionan que el contenido de metanol de una bebida alcohólica está relacionado con el porcentaje de pectina que presenta la materia prima.

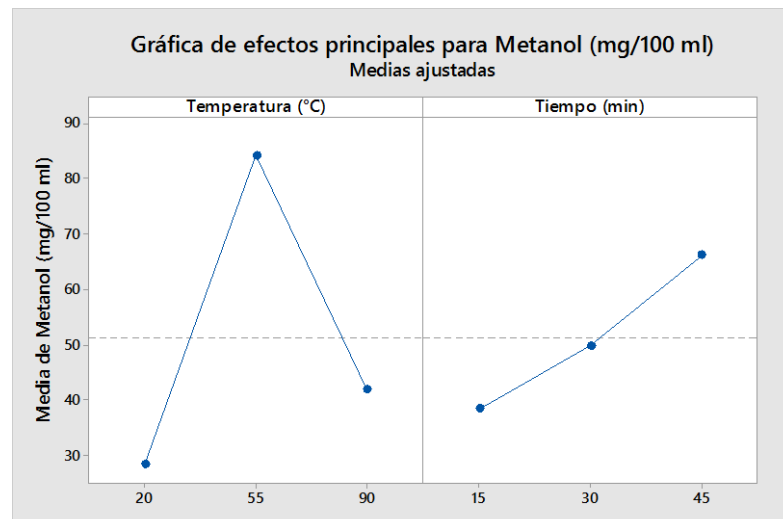
Las concentraciones de metanol en las bebidas fermentadas a partir de los extractos azucarados de semillas de molle se encuentran por debajo de los límites máximos establecidos en la NTP 212.014 (2016) de requisitos para bebidas alcohólicas vitivinícolas – vino quien indica que el valor máximo permitido es de 400 mg /L de muestra.

Figura 43. Diagrama de Pareto para el contenido de metanol en las bebidas fermentada de semillas de molle.



El análisis de varianza mostrado en el Anexo 21 demuestra que el factor tiempo, el factor temperatura y el tratamiento son estadísticamente significantes ($p < 0,05$) sobre el contenido de metanol de la bebida fermentada a partir de los extractos azucarados de semillas de molle. En la Figura 44 se muestra el diagrama de Pareto que describe el análisis de varianza y la influencia de los factores en el contenido de metanol de la bebida fermentada, se observa que las barras que representan al factor temperatura, tiempo y la combinación de temperatura – tiempo, pasan la línea de referencia indicando que la temperatura, el tiempo y la combinación de ambos factores tienen efecto sobre el contenido de metanol.

Figura 44. Gráfica de efectos principales para el contenido de metanol en las bebidas de semillas de molle



En la Figura 44 se observa que la media de las bebidas fermentadas obtenidas a partir de los extractos azucarados obtenidos a 20 °C, 55 °C y 90 °C presentan un contenido de metanol de $13,64 \pm 5,97$ mg/100 ml, $36,96 \pm 2,60$ mg/100 ml y $20,92 \pm 5,33$ mg/100 ml de muestra. Respecto al tiempo se ve que las medias de las bebidas a partir de los extractos obtenidos en 15 minutos tienen menor contenido de metanol y va incrementando conforme el tiempo de extracción se aumenta.

4.4 PROPUESTA DE PRODUCCIÓN DE BEBIDA FERMENTADA DE SEMILLAS DE MOLLE

De acuerdo a los resultados de los análisis fisicoquímicos y por presentar bajo contenido de metanol se plantea realizar extracciones de azúcares de molle a 20°C por 15 minutos. A continuación, se describe las operaciones que se deben seguir y en la figura 45 se muestra el diagrama de bloques cuantitativo que se debe seguir para la elaboración de la bebida fermentada de semillas de molle (Chicha de molle).

4.4.1 Selección

Las semillas de molle no deben estar dañadas; deben ser seleccionadas de tal manera que se encuentren libre de cascarillas, piedras, tallos y otros objetos extraños. Las semillas de molle previamente seleccionadas deben ser pesadas siguiendo la relación de semillas de molle: agua (1: 2,86). Lo cual equivale a 1400 g de semillas de molle para 4000 g de agua.

4.4.2 Extracción de azúcares

La extracción de azúcares se debe realizar sumergiendo las semillas pesadas en el agua a 20°C para su posterior agitación a una velocidad de 120 rpm durante 15 min.

4.4.3 Filtración

Se debe realizar la primera filtración el cual consiste en separar las semillas de la parte líquida utilizando un colador, la segunda filtración se debe realizar con una tela poliéster para separar los restos solidos de menor tamaño. Una vez concluido el proceso de filtración se debe realizar los análisis fisicoquímicos del mosto extraído (°Brix, densidad, pH y acidez total).

4.4.4 Inoculación

Se debe añadir levaduras provenientes de una chicha de molle en fermentación elaborada en condiciones estériles (inóculo), la cantidad de inóculo añadido debe ser de

3,5% respecto al volumen de extracto azucarado obtenido. Una vez añadido el inóculo al extracto azucarado se debe dejar oxigenar durante 30 min.

4.4.5 Fermentación alcohólica

Pasado los 30 min de haber permitido el paso del oxígeno se debe impedir el paso del oxígeno tapando con una boquilla que permita la liberación del CO₂. La fermentación se debe realizar por un periodo de 7 días en temperaturas que no sobre pasen los 30°C. Se recomienda realizar controles (densidad, acidez, pH y °Brix) durante y al finalizar la fermentación alcohólica.

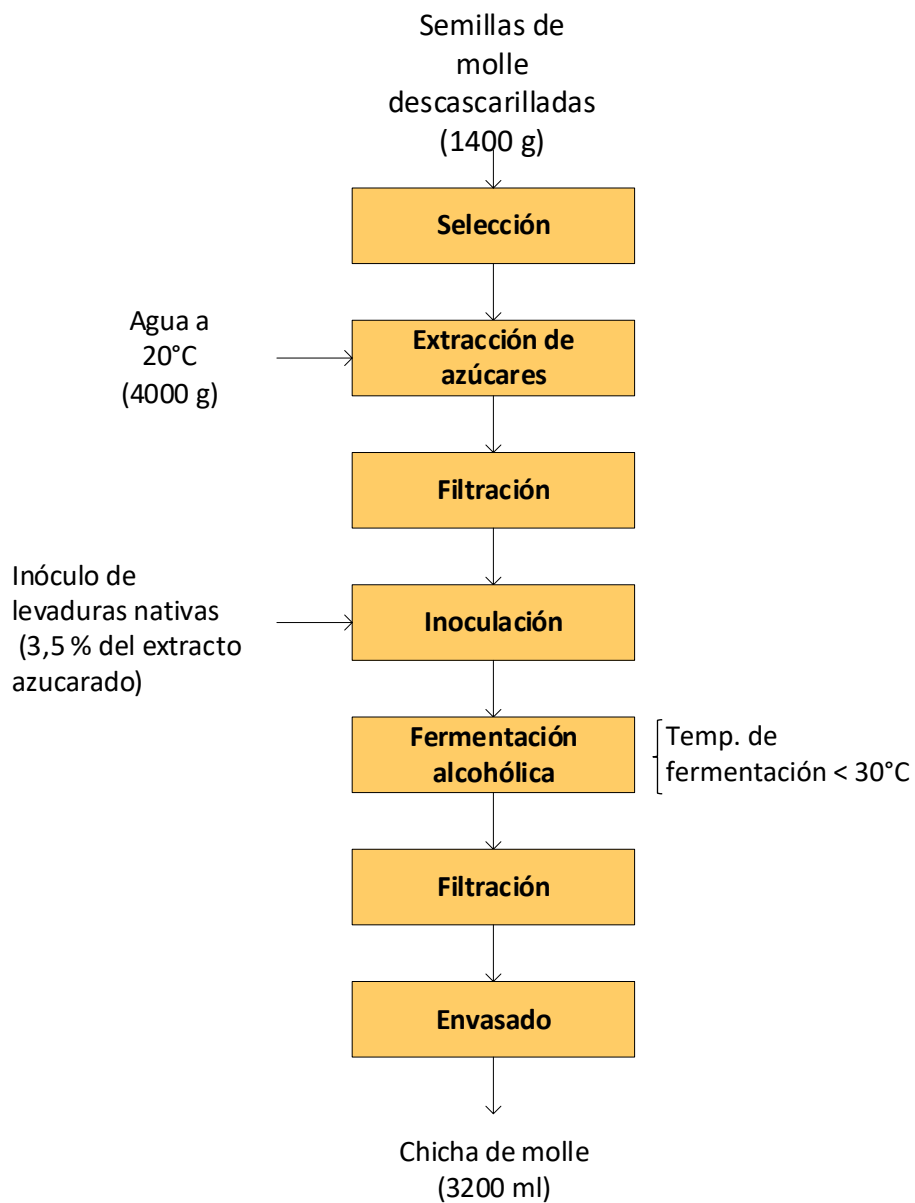
4.4.6 Filtración

Una vez concluida la fermentación se debe realizar la operación de filtrado con una tela poliéster a fin de eliminar las partículas que están en el sedimento y también restos de las levaduras.

4.4.7 Envasado

El envasado se debe realizar en botellas estériles, de preferencia con tapas roscas para ser conservado en un ambiente fresco.

Figura 45. Diagrama de bloques cuantitativo del proceso de elaboración la bebida fermentada de semillas de molle.



CONCLUSIONES

- Las características fisicoquímicas de los extractos azucarados de semillas de molle obtenidos presentan características fisicoquímicas ($8,40 \pm 0,20$ °Brix, densidad $1,0310 \pm 0,0008$ g/ml, pH de $4,23 \pm 0,10$, acidez total $0,288 \pm 0,049$ % exp. Ac. Tartárico) adecuadas para un posterior proceso de fermentación alcohólica.
- Hay presencia de pectina en los extractos azucarados de semillas de molle, en los extractos realizados a 20°C ($0,8120 \pm 0,0690\%$), a 55°C ($0,9886 \pm 0,0936$ %) y a 90°C ($1,1544 \pm 0,1213$ %).
- Existe mayor concentración de metanol ($36,96 \pm 2,60$ mg/100 ml) en las bebidas fermentadas de semillas de molle que provienen de extractos obtenidos a 55°C , en menor proporción con los extractos obtenidos a 20°C y 90°C ($13,64 \pm 5,97$ mg/100 ml de muestra y $20,92 \pm 5,33$ mg/100 ml de muestra).
- Las bebidas fermentadas obtenidas de semillas de molle presentan características fisicoquímicas típicas de una bebida alcohólica con un porcentaje de alcohol de 2,9 a 3 %, acidez total entre 0,448 y 0,529 % exp. Ac. Tartárico y acidez volátil entre 0,012 y 0,032 % exp. Ac. Acético, el cual está dentro de los límites permitidos por ley.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar ensayos de extracción con otras diluciones de agua: semillas de molle (1:4, 1:5 y 1:6) y buscar nuevos métodos de extracción de los azúcares fermentables de semillas de molle (por el método de ultrasonidos).
- Utilizar un método enzimático para la determinación de pectinas en los extractos azucarados de semillas de molle.
- Utilizar el método de cromatografía de masas para la determinación de metanol en las bebidas fermentadas de semillas de molle.
- Evaluar la bebida fermentada de semillas de molle para una posible elaboración de una bebida alcohólica tipo cerveza artesanal.
- Se recomienda elaborar una ordenanza el cual establezca y difunda el procedimiento de elaboración de la chicha de molle para la obtención de una bebida alcohólica inocua.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade A. M. J. (2009). *Efecto de la utilización de enzimas pectolíticas (lallzyme c-max) en un mosto elaborado con levadura vinica (lalvin ec 1118) y de panificación para la producción de vino de manzana variedad Emilia*. [Tesis de bachiller, Universidad Técnica de Ambato].

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/2105/1/AL441%20Ref.%203287.pdf>

Anjos, O., Santos, A. J., Estevinho, L. M., & Caldeira, I. (2016). FTIR–ATR spectroscopy applied to quality control of grape-derived spirits. *Food Chemistry*, 205, 28-35.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0308814616302965>

Anrango P. S. L. (2013) . *Evaluación de tres tipos de Maíz (Zea mays), Suave Morado, Suave Dulce Blanco y Suave Dulce Amarillo, en la elaboración de Chicha de Jora* [Tesis para optar el título profesional, Universidad Politécnica Estatal del Carchi]

<http://repositorio.upec.edu.ec/bitstream/123456789/9/1/018%20EVALUACI%c3%93N%20DE%20TRES%20TIPOS%20DE%20MA%c3%8dZ%20%28%20ZEA%20MAYS%29%20SUAVE%20MORADO%2c%20SUAVE%20DULCE%20BLANCO%20Y%20SUAVE%20DULCE%20AMARILLO%20EN%20LA%20ELABORACI%c3%93N%20DE%20CHICH%20>

Arellano, M. A., Martínez, G. S., Gómez S. C., Navarro U. M. y Seoane, O. Y. (2021). Intoxicación por metanol en Costa Rica: ¿Un problema sanitario o una intoxicación alcohólica más? *Acta Académica*, 69 (noviembre), 143-158.

<http://revista.uaca.ac.cr/index.php/actas/article/view/1329>

Badui, D. S. (2006). *Química de los Alimentos*. Pearson Educación.

Braverman, J.B.S. (1980). *Bioquímica de los Alimentos*. Nueva Edición Z. Berk. Editorial el manual moderno

Bindler, F., Voges, E., y Laugel, P. (2009). The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. *Food Additives & Contaminants*, 5(3), 343-351.

<https://doi.org/10.1080/02652038809373713>

Botelho, G., Anjos, O., Estevinho, L. M., & Caldeira, I. (2020). Methanol in grape derived, fruit and honey spirits: A critical review on source, quality control, and legal limits. *Processes*, 8(12), 1609.

Bouhzam, I. (2020). *Aplicaciones de la Espectroscopia de Infrarrojo Cercano (NIR) para predecir el contenido y la actividad de agua del embutido tipo "Fuet "* [Tesis de maestría, Universidad Politécnica de Catalunya].

<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/328793/BOUHZAM%20TFM.pdf>

Bustamante Vásquez, A. (2019). *Influencia de la temperatura de fermentación en las características fisicoquímicas de la chicha de jora, evaluados en dos variedades de germinados de maíz (Zea mays L.), INIA 603 y marginal 28* [Tesis para optar el título profesional, Universidad Nacional de Cajamarca]

<https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/3150/INFLUENCIA%20DE%20LA%20TEMPERATURA%20DE%20FERMENTACION%20EN%20LAS%20CARACTERISTICAS%20FISICOQUIMICAS%20DE%20LA%20CHICHA%20D.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Bustillo M, C.A. (2008). *Obtención de riboflavina (vitamina B2) por proceso de fermentación sumergida en medio de producción de agua de cocimiento de maíz y aceite de soya utilizando como microorganismo productor Saccharomyces cerevisiae* [Tesis para optar el título profesional, Universidad de El Salvador]

<https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/2943/1/16100341.pdf>

Blumenthal, P., Steger, M. C., Einfalt, D., Rieke-Zapp, J., Quintanilla Bellucci, A., Sommerfeld, K. y Lachenmeier, D. W. (2021). Methanol mitigation during manufacturing of fruit spirits with special consideration of novel coffee cherry spirits. *Molecules*, 26(9), 2585.

Cabarcas, E., Guerra, A., y Henao, C. (2012). *Extracción y caracterización de pectina a partir de cáscaras de plátano para desarrollar un diseño general del proceso de producción* [Tesis doctoral; Universidad de Cartagena].

<https://repositorio.unicartagena.edu.co/bitstream/handle/11227/109/Trabajo%20de%20grado-Extraccion%20y%20caracterizacion%20de%20pectina%20a%20partir%20de%20ca>

scaras%20de%20plata%20para%20desarrollar%20un%20dise%C3%B1o%20genera-1.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Carbonell, E., Costell, E., & Durán, L. (1990). Determinación del contenido en pectinas en productos vegetales. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 30(1), 1-9.

<https://pascalfrancis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=6865828>

Chasquibol, S. N., Arroyo B. E. y Morales, G. J. (2008). Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Ingeniería Industrial*, (026), 175-199.

<https://www.redalyc.org/pdf/3374/337428492010.pdf>

Coldea, T. E., Socaciu, C., Fetea, F., RANGA, F., Pop, R. M., y Florea, M. (2013). Rapid quantitative analysis of ethanol and prediction of methanol content in traditional fruit brandies from Romania, using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(1), 143-149.

<https://notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/9000>

Costion, K. (2012). Huaracane production and consumption of chicha de molle at Yahuary Alta: an example of indigenous agency in a colonial landscape. In *77th Annual meeting of the Society for American Archaeology, Memphis, TN*.

https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/38180508/Costion_SAA2012_Huaracane_Chica_de_Molle-libre.pdf?1436839222=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DHuaracane_Production_and_Consumption_of.pdf&Expires=1675190168&Signature=CLebnZ8iS1eJnS-0Nda9wNBjp1iBPxG7YFbuwgPyJqXGZZcXdVQ1VTutN8iQdxWQF~ntu9c~KIB0ToKEqQ6fMhGJwEsdyYV9WIsQI2nJ2WTA~QfceMqeTLScM7XB1XSRmeqwGzXKyjJ5ligoQpr~g4QoZ5bHO7TQYOxFbUgG6ferFynbxh6NHnJkHd1etgnid4usehuTPkKukqfUHSCV7HA66iktlt7oEujwNDdmZjf69VXtsd6vbaGEIHSfWcZ6Cv3Xjov3KX9oEny88RFGCA8n13VaDRuT2mNmm~~XGKR8hAJullmKkfAPIZ6UcKbYzYSXckHzaRQxpHzyvwebCw__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

Dellacassa, E. (2010). Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la flora aromática latinoamericana: proyecto CYTED IV. 20. *EdiPUCRS*.

https://www.researchgate.net/publication/275244075_Normalizacion_de_productos_naturales_obtenidos_de_especies_de_la_Flora_Aromatica_Latinoamericana_Proyecto_CYTED_IV20_Organizador_Eduardo_Dellacassa_Ed_ediPUCRS_Porto_Alegre_2010_Brasil_ISBN_978-85-397

Díaz, B. J. y Marín, M. D. (2020). *Obtención de licores destilados a partir de frutos exóticos nacionales*. [Tesis para optar el título profesional; Universidad de los Andes de Bogotá].

<https://repositorio.uniandes.edu.co/bitstream/handle/1992/44744/u830927.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ferreira A. S. (2007) *Pectinas: aislamiento, caracterización y producción a partir de frutas tropicales y de los residuos de su procesamiento industrial*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Colombia].

FDA. (1996). "Food and Drug Administration 21 CFR Part 172, Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Dimethyl Dicarbonate. Federal Register 61(104) Rules and Regulations". *Authenticated U.S. Government Information GPO*.

<https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1996-05-29/pdf/96-13303.pdf>

Flores, R. B., Mariños, D. C., Rodríguez, N. B. y Rodríguez, D. S. (2013). Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus medica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Agroindustrial Science*, 3(2), 77-89.

<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/500/475>

FDA. (1996). "Food and Drug Administration 21 CFR Part 172, Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Dimethyl Dicarbonate. Federal Register 61(104) Rules and Regulations". *Authenticated U.S. Government Information GPO*.

<https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-1996-05-29/pdf/96-13303.pdf>

Flores, R. B., Mariños, D. C., Rodríguez, N. B. y Rodríguez, D. S. (2013). Optimización de las condiciones de extracción de pectina a partir de cáscara de limón francés (*Citrus medica*) utilizando la metodología de superficie de respuesta. *Agroindustrial Science*, 3(2), 77-89.

<https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/500/475>

Feriani, A., Tir, M., Hamed, M., Sila, A., Nahdi, S., Alwasel, S., ... & Tlili, N. (2020). Multidirectional insights on polysaccharides from *Schinus terebinthifolius* and *Schinus molle* fruits: Physicochemical and functional profiles, in vitro antioxidant, anti-genotoxicity, antidiabetic, and antihemolytic capacities, and in vivo anti-inflammatory and anti-nociceptive properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 165, 2576-2587.

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33096174/>

Fraizier, W. y Westhoff, D. (2003). *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza España: ACRIBIA S.A.

Fredes Monsalves, C., Loyola López, N., & Muñoz Cruz, J. C. (2009). Extracción de pectinas de *Vitis labrusca* cv. concord para producir jaleas. *Idesia (Arica)*, 27(3), 9-14.

https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292009000300002

Gallejos, T. A. y Hidalgo, P. C. (2009). *Parámetros de deshidratación; semilla de molle; schinus molle linneo anacardiaceae; obtención de un polvo; especias naturales* [Tesis para la obtención del Título profesional ; Universidad Técnica del Norte. Ibarra-Ecuador].

<http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/389>

García V, D. D., y Mamani G, G. M. (2008). *Selección de levaduras nativas Saccharomyces cerevisiae aisladas de chicha de jora del Valle del Mantaro* [Tesis para optar el título profesional, Universidad Nacional del Centro]

García, M., Quintero, R., y López, A. (2002). *Biotecnología Alimentaria*. México, D.F. : Limusa : Noriega editores. (664.024 GARC)

García, C. J y Xirau, V. M. (2005). *Técnicas usuales de análisis en enología*. Panreac Química S.A.

Goldstein, D. J., y Coleman, R. C. (2004). *Schinus molle* L.(Anacardiaceae) chicha production in the central Andes. *Economic Botany*, 58(4), 523-529.

<https://www.jstor.org/stable/4256866>

González, S. H., Hernández, L. J. D., y Hendrik, G. J. (2020). Metanol: tolerancias y exigencias en las normas para mezcal y bebidas de agave. *Rivar (Santiago)*, 7(19), 1-21.

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0719-49942020000100001&script=sci_abstract

Botelho, G., Anjos, O., Estevinho, L. M., y Caldeira, I. (2020). Methanol in grape derived, fruit and honey spirits: A critical review on source, quality control, and legal limits. *Processes*, 8(12), 1609.

<https://www.mdpi.com/2227-9717/8/12/1609>

Gutierrez, V. C., & Cori, M. W. (2014) *Aplicación de la cromatografía de gases en la determinación de metanol en bebidas alcoholicas* [Tesis doctoral, Universidad Mayor de San Andres].

<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/10798/MT-1424-Gutierrez%20Villalobos%2c%20Corina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Harris, D. C. (2016). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.

<https://www.rachidscience.com/2020/10/libro-analisis-quimico-cuantitativo.html>

Hang, Y. D. y Woodams, E. E. (2010). Influence of apple cultivar and juice pasteurization on hard cider and eau-de-vie methanol content. [Influencia del cultivar de manzana y la pasteurización del jugo en el contenido de metanol de la sidra dura y el aguardiente]. *Bioresource Technology*, 101(4), 1396-1398.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852409013194>

Humerez H, F., y Gemio S, R. *Determinación de congéneres (Esteres y aldehídos) en bebidas alcohólicas destiladas empleando una técnica volumétrica* [Tesis doctoral, Universidad Mayor de San Andrés].

<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/19065/PG-342.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Ibarra Acurio, G. A. (2006). *Elaboración de vino a partir de pijuayo (Bactris Gasipaes)* [Tesis para optar el título profesional, Universidad Tecnica de Ambato].

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/4172/1/P.AL75%20Ref.2964.pdf>

INACAL (2007). NTP 210.026. Bebidas alcohólicas. Sidra. Requisitos. Segunda edición.

INACAL (2016). NTP 212.014. Bebidas alcohólicas vitivinícolas. Vinos. Requisitos. Tercera edición.

INACAL (2012). NTP 211.009. Bebidas alcohólicas. Licores. Requisitos. Cuarta edición.

INACAL (2019). NTP 212.030. Bebidas alcohólicas. Vinos. Determinación del grado alcohólico. 2ª Edición

INACAL (2019). NTP 212.030. Bebidas alcohólicas. Determinación de metanol y de cogeneres en bebidas alcohólicas y en alcohol etílico empleado en su elaboración, mediante cromatografía de gases.

INACAL (2019). NTP 211.040. Bebidas alcohólicas. Método de ensayo. Determinación de acidez. 3a Edición.

Iza, A. (2011). *Aprovechamiento de la zanahoria amarilla (Daucus carota) tratada enzimáticamente en la obtención de una bebida tipo vino. Aprovechamiento de la zanahoria amarilla (Daucus carota) tratada enzimáticamente en la obtención de de una bebida tipo vino* [Tesis para optar el título profesional, Universidad Técnica de Ambato].

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3089/1/AL472.pdf>

Jiménez I, D., Abreu C, A., López L, V. E., Tellez J, A., y Gracida R, J. N. (2012). Obtención de azúcares fermentables mediante hidrólisis ácida de Beta vulgaris L. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 28(2), 151-158.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992012000200006#f6

Juárez, R. F. (2011). *Optimización de parámetros para la producción y envasado de chicha de Schinus molle," molle"*. [Tesis para optar el título profesional; Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga].

https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNSJ_0e65bbb326f261901bc9ca2662d6347f

- KRETZSCHMAR H. (1961). *Levaduras y Alcoholes y otros productos de la Fermentación*. Primera Edición. Editorial Reverte S.A. Zaragoza – ES. Págs. 177 – 180
- Llanos A, S. K. (2012). *Extracción y caracterización del aceite esencial de molle (Schinus molle L.)*. [Tesis para obtener el título profesional, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann]

http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/2917/14_2012_llanos_arapa_sk_fcag_industrias_alimentarias.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Lliuyacc L, R. (2018). *Efecto de la Temperatura, Tiempo y ph en el Rendimiento de Extracción de Pectina en Cáscara de Tumbo Serrano (Passiflora tripartita L.)*. [Tesis para optar el título profesional, Universidad Nacional de Huancavelica].
- Luna, D. (2012). *Estandarización de los parámetros de validación de un método analítico para cuantificar la concentración de metanol en bebidas alcohólicas utilizando cromatografía de gases*. [Tesis para obtener el título profesional; Universidad Técnica de Ambato].

<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/3070/1/BQ24.pdf>
- Magne, M. R. (2018). *Caracterización dendrológica y física de la semilla de dos especies de árboles forestales molle (Schinus molle) y fresno (Fraxinus excelsior)*. [Tesis para obtener el título profesional; Universidad Mayor de San Andrés].
<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/20116/TD-2597.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Maldonado, A. (1920). Contribución al estudio de la materia médica peruana. *Anales de la Facultad de Medicina* .Vol. 7, No. 1. 60-87).

<https://doi.org/10.15381/anales.v7i1.10346>
- NOM-142-SSA1 (1995). Bienes y servicios. Bebidas alcohólicas. Especificaciones sanitarias. Etiquetado sanitario y comercial. Diario oficial de la Federación.

https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4886936&fecha=09/07/1997#:~:text=1.1%20La%20presente%20Norma%20Oficial,comercialicen%20en%20el%20territorio%20nacional.
- NTON 03038 (2002). NORMA TECNICA OBLIGATORIA NICARAGÜENSE. BEBIDAS FERMENTADAS. CERVEZA, ESPECIFICACION.

<https://xdoc.mx/documents/norma-tecnica-de-cerveza-5eb4716e212ce>

Ohimain, E. I. (2016). Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. [Contaminación por metanol en bebidas alcohólicas fermentadas tradicionalmente: la dimensión microbiana]. *Springerplus*, 5(1), 1-10.

<https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-3303-1>

Oña C, T. F. (2020). *Evaluación del aprovechamiento del rechazo de banano (Musa paradisiaca) para la obtención de una bebida alcohólica tipo vodka* [Tesis para optar el título profesional, Universidad Técnica Estatal de Quevedo].

<https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/6594>

Paine, A.J. y Dayan, A.D. (2001). "Defining a Tolerable Concentration of Methanol in Alcoholic Drinks". *Human & Experimental Toxicology* 20: 563-568. <https://doi.org/10.1191/096032701718620864> [

Paredes, M. R., Flores, P. L., Ledesma, J. M. (2019). Industrialización del fruto de molle. *Ciencia y Desarrollo*, (6), 64–70

<https://doi.org/10.33326/26176033.1999.6.110>

Parlamento Europeo y del Consejo Unión Europea (2019) Definición, descripción, presentación y etiquetado de bebidas espirituosas, uso de denominaciones de bebidas espirituosas en la presentación y etiquetado de otros productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea L 130*, 1–54.

<https://www.boe.es/doue/2019/130/L00001-00054.pdf>

Quispe, M. J. y Azañero, S. K. (2019). *Determinación de Metanol en bebidas alcohólicas expendidas en los centros de diversión nocturna del centro de Huancayo–Periodo 2018*. [Tesis para obtener el título profesional; Universidad Peruana Los Andes].

<https://repositorio.upla.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12848/1677/TESIS%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Röe, O. (1982). Species Differences in Methanol Poisoning. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 10: 275-287

<https://doi.org/10.3109/10408448209003368>

Rodríguez C, J., & García-Godos Alcázar, P. (2017). Capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas de chicha de molle. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 83(4), 391-402.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2017000400004

LAFFORT (2022) Tabla de correspondencia de las diferentes escalas de medida de la concentración de azúcares en mosto.

https://laffort.com/wp-content/uploads/Protocols/ES_Table_Convertisseur.pdf

Sánchez, L. (2005). *Determinación de metanol en bebidas alcohólicas fermentadas tradicionales y populares de mayor consumo en dos regiones de la República de Guatemala por cromatografía de gases*. [Tesis para optar el título profesional; Universidad de San Carlos de Guatemala].

http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2379.pdf

Scragg, A. (1996). *Biotecnología para ingenieros sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. 1ª Edición, editorial Limusa, México.

Solís, G. A., Rivas, G. P., Escamila, A. C., Rico, M. R., Bravo, Sánchez, M. G. y Botello, Á. J. (2017). Methanol production kinetics during agave cooking for mezcal industry. [Cinética de producción de Metanol durante la cocción del agave en la industria del mezcal]. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 16(3), 827-834.

<https://www.redalyc.org/pdf/620/62053304012.pdf>

VERDECHACO (2007). Aguaribay (*Schinus molle*) / Molle / Falso pimentero

<http://arbolesdelchaco.blogspot.com/2007/09/aguaribay-molle-falso-pimentero.html>

Williams, P. R., J Nash, D., Henkin, J. M., & Armitage, R. A. (2019). Archaeometric approaches to defining sustainable governance: wari brewing traditions and the building of political relationships in Ancient Peru. *Sustainability*, 11(8), 2333.

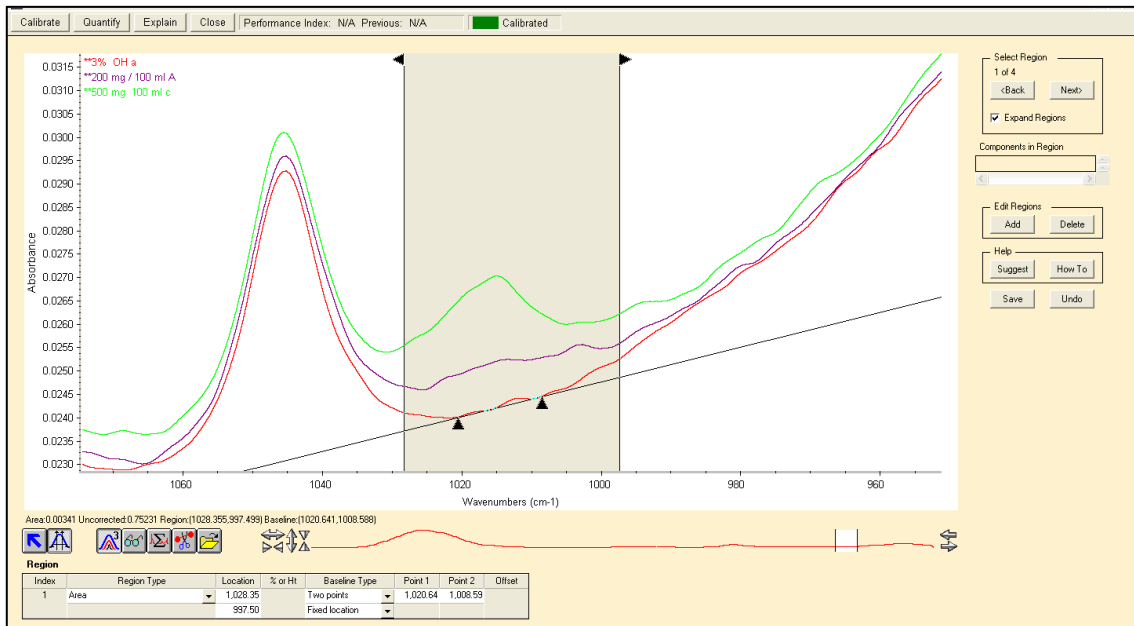
<https://doi.org/10.3390/su11082333>

ANEXOS

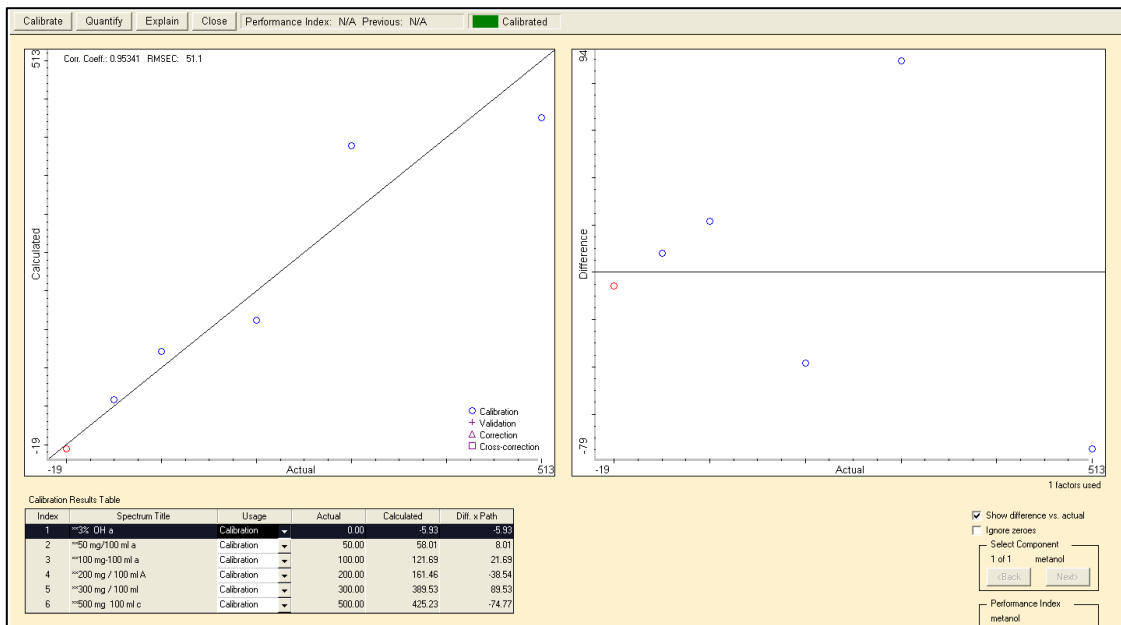
Anexo 1. Tabla de correspondencia de las diferentes escalas de medida de la concentración de azúcares en mosto

°Bx		°Oe	°B		Grado Alcohólico Potencial según elrendimiento en alcohol (azúcares por 1% vol.alcohol)		
Gra oBrix	Densidad	Grado Oechsle	Grado Baumé	Azúcare s(g/L)	16,83 g/L	17 g/L	18 g/L
14,0	1,0568	56,8	7,763	129,0	7,66	7,59	7,17
13,8	1,0560	56,0	7,652	126,3	7,50	7,43	7,02
13,6	1,0551	55,1	7,542	123,6	7,34	7,27	6,86
13,4	1,0543	54,3	7,432	121,9	7,24	7,17	6,77
13,2	1,0534	53,4	7,322	119,2	7,08	7,01	6,62
13,0	1,0526	52,6	7,211	117,6	6,99	6,92	6,53
12,8	1,0518	51,8	7,101	116,0	6,89	6,82	6,44
12,6	1,0509	50,9	6,991	113,2	6,73	6,66	6,29
12,4	1,0501	50,1	6,880	111,0	6,60	6,53	6,17
12,2	1,0492	49,2	6,770	108,4	6,44	6,38	6,02
12,0	1,0484	48,4	6,660	106,8	6,35	6,28	5,93
11,8	1,0475	47,5	6,549	104,1	6,18	6,12	5,78
11,6	1,0467	46,7	6,439	103,3	6,14	6,08	5,74
11,4	1,0459	45,9	6,329	100,3	5,96	5,90	5,57
11,2	1,0450	45,0	6,218	98,1	5,83	5,77	5,45
11,0	1,0442	44,2	6,108	95,0	5,64	5,59	5,28
10,8	1,0434	43,4	5,997	93,4	5,55	5,49	5,19
10,6	1,0425	42,5	5,887	91,3	5,42	5,37	5,07
10,4	1,0417	41,7	5,776	89,6	5,32	5,27	4,98
10,2	1,0409	40,9	5,666	87,8	5,22	5,16	4,88
10,0	1,0400	40,0	5,555	84,9	5,04	4,99	4,71
9,8	1,0392	39,2	5,444	82,2	4,88	4,84	4,57
9,6	1,0384	38,4	5,334				
9,4	1,0376	37,6	5,223				
9,2	1,0367	36,7	5,112				
9,0	1,0359	35,9	5,002				
8,8	1,0351	35,1	4,891				
8,6	1,0343	34,3	4,780				
8,4	1,0334	33,4	4,670				
8,2	1,0326	32,6	4,559				
8,0	1,0318	31,8	4,448				
7,8	1,0310	31,0	4,337				



Anexo 2. Área de trabajo para la determinación de metanol



Anexo 3. Curva de calibración de metanol 0 mg/100 ml a 500 mg/100 ml



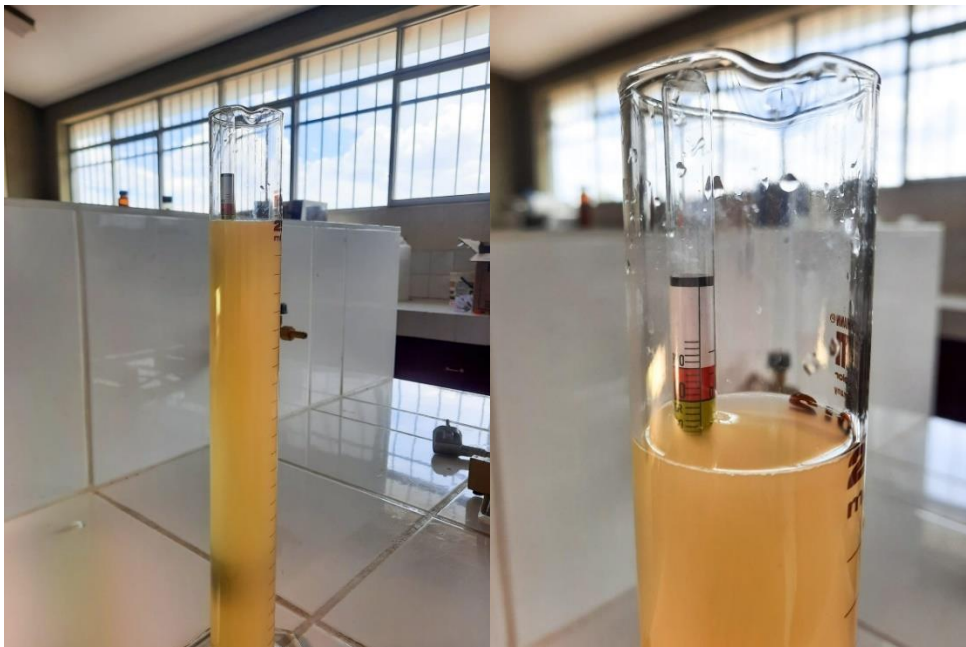
Anexo 4. Resultados del análisis de metanol por cromatografía de gases de una muestra de chicha de molle de la localidad de santa bárbara

	<p align="center">CENTRO DE INNOVACION PRODUCTIVA Y TRANSFERENCIA TECNOLOGICA AGROINDUSTRIAL ICA</p> <p align="center">Panamericana Sur Km. 293.2, Distrito Salas – Guadalupe Ica – Perú. TELEFONO (056)406056 TELEFAX (056)406224, E.MAIL: citeagroindustrial@citeagroindustrial.com.pe</p>										
LABORATORIO DE ALIMENTOS Y BEBIDAS											
INFORME FINAL DEL ENSAYO N° 272 LAB/21											
DATOS GENERALES											
<p>Nombre del Solicitante: NATALY DANITZA CHAVEZ NUÑEZ</p>											
<p>Dirección: AV. CUSCO #819</p>											
DATOS DE LA MUESTRA											
<p>Código de la Muestra: 77</p>											
<p>Nombre de la Muestra: FERMENTO <small>(Información Proporcionada por el solicitante)</small></p>											
<p>Identificación y Estado: 01 muestra en botella de plastico, aproximadamente 600 mL. Sin identificación.</p>											
<p>Marca: No indica</p>	<p>Fecha de Muestreo: 21.11.2021</p>										
<p>Lugar del Muestreo: Ayacucho <small>(Descripción por el Solicitante)</small></p>	<p>Fecha de Recepción: 13.12.2021</p>										
<p>Muestreado por: Nataly Danitza Chavez Nuñez <small>(Información Proporcionada por el solicitante)</small></p>	<p>Fecha de Ejecución del Ensayo: 20.12.2021 al 22.12.2021</p>										
RESULTADOS											
<table border="1" data-bbox="352 1330 1334 1435"> <thead> <tr> <th>Determinación</th> <th>Unidad de medida</th> <th>Resultados</th> <th>Método de ensayo</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Alcohol Metilico</td> <td>mg/100 ml A.A</td> <td>61.3</td> <td>NTP 211.035:2019</td> </tr> </tbody> </table> <p><small>Temperatura ambiente: 20°C y Humedad Relativa: 47.7% A.A= Alcohol Anhidro</small></p>				Determinación	Unidad de medida	Resultados	Método de ensayo	Alcohol Metilico	mg/100 ml A.A	61.3	NTP 211.035:2019
Determinación	Unidad de medida	Resultados	Método de ensayo								
Alcohol Metilico	mg/100 ml A.A	61.3	NTP 211.035:2019								
CONDICIONES DEL INFORME		FIRMA									
<ul style="list-style-type: none"> Los resultados obtenidos se refieren únicamente a la muestra analizada. Este informe no puede reproducirse, más que en su totalidad, sin la autorización por escrito del laboratorio. Los resultados del ensayo no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. El Laboratorio se libera de responsabilidad, cuando la información de la muestra proporcionada por el solicitante pueda afectar la validez de los resultados. 		<div style="text-align: center;">  <p><small>Firmado digitalmente por ANCHANTE CARRASCO Ely Giovanna FAU 20131369477 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 22.12.2021 13:46:02 -05:00</small></p> <p>.....</p> <p>Responsable del Laboratorio de Alimentos y Bebidas Ing. Ely Anchante Carrasco</p> <p>Fecha de Emisión del Informe: 22.12.2021</p> </div>									
Código: SIG-PG-02-R10	Versión: 05	Fecha: 08-02-2021									

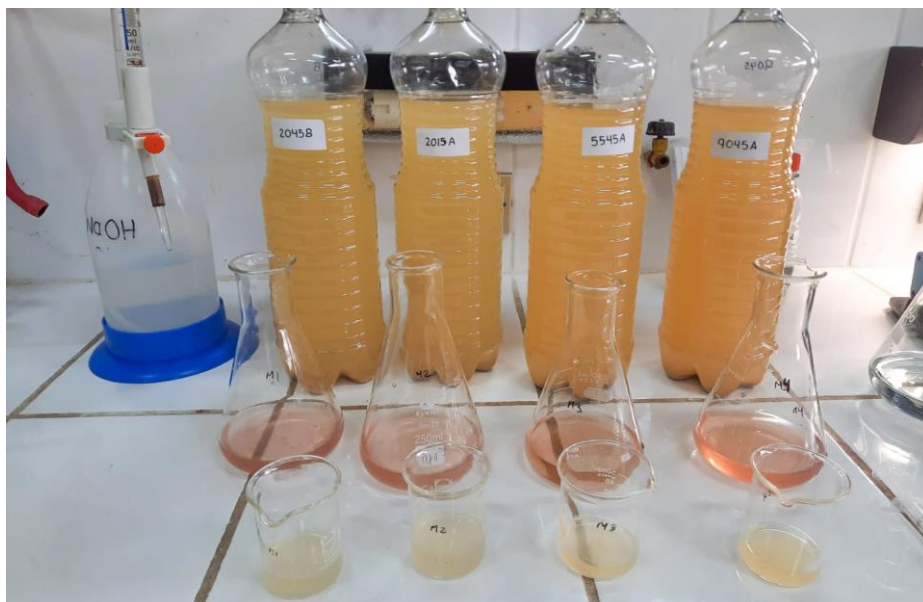
Anexo 5. Lectura de densidad inicial del extracto azucarado de semillas de molle (mosto).



Anexo 6. Lectura de densidad de la bebida fermentada



Anexo 7. Análisis de acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle.



Anexo 8. Análisis de acidez volátil de la bebida fermentada de semillas de molle.



Anexo 9. Destilación de la bebida fermentada



Anexo 10. Muestras patrón



Anexo 11. Análisis de Varianza de °Brix de los mostos

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,5602	0,07002	2,16	0,083
Lineal	4	0,4120	0,10301	3,18	0,039
Temperatura	2	0,1713	0,08565	2,64	0,099
Tiempo	2	0,2407	0,12037	3,71	0,045
Interacciones de 2 términos	4	0,1481	0,03704	1,14	0,368
Temperatura*Tiempo	4	0,1481	0,03704	1,14	0,368
Error	18	0,5833	0,03241		
Total	26	1,1435			

Anexo 12. Análisis de Varianza de densidad (g/ml) de los extractos azucarados de semillas de molle.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,000008	0,000001	1,80	0,143
Lineal	4	0,000006	0,000001	2,60	0,071
Temperatura (°C)	2	0,000003	0,000001	2,60	0,102
Tiempo (min)	2	0,000003	0,000001	2,60	0,102
Interacciones de 2 términos	4	0,000002	0,000001	1,00	0,433
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	0,000002	0,000001	1,00	0,433
Error	18	0,000010	0,000001		
Total	26	0,000018			

Anexo 13. Análisis de Varianza del pH de los extractos azucarados de semillas de molle

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,265800	0,033225	21,93	0,000
Lineal	4	0,254867	0,063717	42,06	0,000
Temperatura	2	0,249800	0,124900	82,45	0,000
Tiempo	2	0,005067	0,002533	1,67	0,216
Interacciones de 2 términos	4	0,010933	0,002733	1,80	0,172
Temperatura*Tiempo	4	0,010933	0,002733	1,80	0,172
Error	18	0,027267	0,001515		
Total	26	0,293067			

Anexo 14. Análisis de Varianza de la acidez total del mosto (%Ac. Tartárico)

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,025817	0,003227	1,40	0,263
Lineal	4	0,021333	0,005333	2,31	0,097
Temperatura (°C)	2	0,017617	0,008808	3,82	0,042
Tiempo (min)	2	0,003717	0,001858	0,81	0,463
Interacciones de 2 términos	4	0,004483	0,001121	0,49	0,746
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	0,004483	0,001121	0,49	0,746
Error	18	0,041550	0,002308		
Total	26				

Anexo 15. Análisis Varianza del % de pectina de los extractos azucarados de semillas de molle

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,744092	0,093011	175,65	0,000
Lineal	4	0,732388	0,183097	345,77	0,000
Temperatura (°C)	2	0,527021	0,263511	497,63	0,000
Tiempo (min)	2	0,205367	0,102683	193,91	0,000
Interacciones de 2 términos	4	0,011704	0,002926	5,53	0,004
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	0,011704	0,002926	5,53	0,004
Error	18	0,009532	0,000530		
Total	26	0,753623			

Anexo 16. Análisis Varianza de la densidad final de la bebida fermentada

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0.000003	0.000000	1.83	0.137
Lineal	4	0.000002	0.000001	2.27	0.101
Temperatura (°C)	2	0.000000	0.000000	0.50	0.613
Tiempo (min)	2	0.000002	0.000001	4.04	0.035
Interacciones de 2 términos	4	0.000001	0.000000	1.39	0.278
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	0.000001	0.000000	1.39	0.278
Error	18	0.000004	0.000000		
Total	26	0.000008			

Anexo 17. Análisis de varianza del pH de la bebida fermentada

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,097800	0,012225	32,36	0,000
Lineal	4	0,065578	0,016394	43,40	0,000
Temperatura (°C)	2	0,061756	0,030878	81,74	0,000
Tiempo (min)	2	0,003822	0,001911	5,06	0,018
Interacciones de 2 términos	4	0,032222	0,008056	21,32	0,000
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	0,032222	0,008056	21,32	0,000
Error	18	0,006800	0,000378		
Total	26	0,104600			

Anexo 18. Análisis de varianza de la acidez total de la bebida fermentada de semillas de molle

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,035729	0,004466	38,74	0,000
Lineal	4	0,032501	0,008125	70,47	0,000
Temperatura (°C)	2	0,028848	0,014424	125,11	0,000
Tiempo (min)	2	0,003653	0,001827	15,84	0,000
Interacciones de 2 términos	4	0,003228	0,000807	7,00	0,001
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	0,003228	0,000807	7,00	0,001
Error	18	0,002075	0,000115		
Total	26	0,037805			

Anexo 19. Análisis Varianza de la acidez volátil (% Ac. acético) de la bebida fermentada

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,002132	0,000267	84,58	0,000
Lineal	4	0,002130	0,000532	168,96	0,000
Temperatura (°C)	2	0,002125	0,001062	337,10	0,000
Tiempo (min)	2	0,000005	0,000003	0,81	0,459
Interacciones de 2 términos	4	0,000003	0,000001	0,20	0,933
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	0,000003	0,000001	0,20	0,933
Error	18	0,000057	0,000003		
Total	26	0,002189			

Anexo 20. Análisis Varianza de los grados Alcohólicos de la bebida fermentada

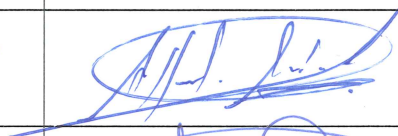
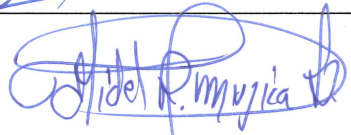

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	0,027407	0,003426	2,31	0,067
Lineal	4	0,014815	0,003704	2,50	0,079
Temperatura (°C)	2	0,009630	0,004815	3,25	0,062
Tiempo (min)	2	0,005185	0,002593	1,75	0,202
Interacciones de 2 términos	4	0,012593	0,003148	2,13	0,120
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	0,012593	0,003148	2,13	0,120
Error	18	0,026667	0,001481		
Total	26	0,054074			

Anexo 21. Análisis Varianza del contenido de metanol (mg /100 ml) de las bebidas fermentadas de semillas de molle.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	8	18913.3	2364.17	261.40	0.000
Lineal	4	18778.7	4694.68	519.07	0.000
Temperatura (°C)	2	15270.7	7635.35	844.21	0.000
Tiempo (min)	2	3508.0	1754.01	193.93	0.000
Interacciones de 2 términos	4	134.6	33.66	3.72	0.022
Temperatura (°C)*Tiempo (min)	4	134.6	33.66	3.72	0.022
Error	18	162.8	9.04		
Total	26	19076.1			

ACTA DE CONFORMIDAD

Los que suscribimos, miembros del jurado para el acto público de sustentación de la tesis titulado “EFECTO DEL TIEMPO Y TEMPERATURA DE EXTRACCIÓN DE AZÚCARES FERMENTABLES EN EL CONTENIDO DE METANOL DE LA BEBIDA FERMENTADA DE SEMILLAS DE MOLLE (*Schinus molle* L.)” presentado por la Bachiller en Ingeniería en Industrias Alimentarias Nataly Danitza CHAVEZ NUÑEZ, el cual fue expuesto el 03 de marzo del 2023, en merito a la resolución decanal N° 040-2023-UNSCH-FIQM/D, damos la conformidad al trabajo final corregido, aceptando la publicación final de la mencionada tesis y declaramos el documento apto para que pueda iniciar sus gestiones administrativas que conduzca a la expedición y entrega del título profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

MIEMBROS DEL JURADO	DNI	FIRMA
Dr. Alfredo ARIAS JARA	28259736	
Dr. Fidel MUJICA LENGUA	28298827	
Mg. Julio Pablo GODENZI VARGAS	31653868	



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

El Director de la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, hace CONSTAR:

Que, la Srta. Nataly Danitza CHAVEZ NUÑEZ, egresada de la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias ha remitido, con el aval y por intermedio de su asesor el Ing. Jesús Javier Paniagua Segovia, la Tesis: *“Efecto del tiempo y temperatura de extracción de azúcares fermentables en el contenido de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle (Schinus molle L.)”*; y se precisa con el Informe de Originalidad de Turnitin, que el índice de similitud del trabajo es de 10% y que se ha generado el Recibo digital que confirma el Depósito que el trabajo ha sido recibido por Turnitin con fecha mayo 25 de 2023 e Identificador de la Entrega N° 2101909947.

Se expide la presente, para los fines pertinentes.

Ayacucho, junio 01 de 2023.



Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga
Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia
E.P. Ingeniería Industrias Alimentarias

Dr. Alberto Luis HUAMANI HUAMANI
DIRECTOR

c.c. : Archivo digital.
Constancia N° 102



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Nataly Danitza CHAVEZ NUÑEZ
Título del ejercicio: Efecto del tiempo y temperatura de extracción de azúcares f...
Título de la entrega: Efecto del tiempo y temperatura de extracción de azúcares f...
Nombre del archivo: NATALY_CHAVEZ_NU_EZ-_TESIS_FINAL.pdf
Tamaño del archivo: 3.89M
Total páginas: 112
Total de palabras: 25,537
Total de caracteres: 133,961
Fecha de entrega: 25-may.-2023 04:07p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 2101909947

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS



“TESIS”

Efecto del tiempo y temperatura de extracción de azúcares
fermentables en el contenido de metanol de la bebida fermentada
de semillas de molle (*Schinus molle* L.)

PRESENTADO POR:

Bach. Nataly Danitza Chavez Nuñez

Para optar el Título Profesional de:

INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

ASESORADO POR:

Ing. Jesús Javier Paniagua Segovia

AYACUCHO- PERU

2023

Efecto del tiempo y temperatura de extracción de azúcares fermentables en el contenido de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle (*Schinus molle* L.)

por Nataly Danitza CHAVEZ NUÑEZ

Fecha de entrega: 25-may-2023 04:07p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2101909947

Nombre del archivo: NATALY_CHAVEZ_NU_EZ-_TESIS_FINAL.pdf (3.89M)

Total de palabras: 25537

Total de caracteres: 133961

Efecto del tiempo y temperatura de extracción de azúcares fermentables en el contenido de metanol de la bebida fermentada de semillas de molle (Schinus molle L.)

INFORME DE ORIGINALIDAD

10%

INDICE DE SIMILITUD

10%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	apptransparencia.unsch.edu.pe Fuente de Internet	2%
2	docplayer.es Fuente de Internet	1%
3	repositorio.upec.edu.ec Fuente de Internet	1%
4	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1%
6	www.scielo.cl Fuente de Internet	<1%
7	core.ac.uk Fuente de Internet	<1%
8	1library.co Fuente de Internet	<1%

9	repositorio.uta.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
10	repositorio.unamba.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
11	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
12	renati.sunedu.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
13	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	repositorio.uwiener.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
15	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
16	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
17	pt.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
18	archive.org Fuente de Internet	<1 %
19	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
20	redi.unjbg.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

21 repositorio.unapiquitos.edu.pe <1 %
Fuente de Internet

22 Sánchez Olguín Erika Nayeli. "Caracterización físicoquímica y sensorial de vinos tintos de las variedades tempranillo y Syrah procedentes de México, España y Argentina", TESIUNAM, 2013 <1 %
Publicación

23 aprenderly.com <1 %
Fuente de Internet

24 cideteq.repositorioinstitucional.mx <1 %
Fuente de Internet

25 repositorio.uc.cl <1 %
Fuente de Internet

26 dspace.unitru.edu.pe <1 %
Fuente de Internet

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

DATOS

1. Apellidos y Nombres, N° DNI de los autores

Apellidos y Nombres	DNI
Chavez Nuñez, Nataly Danitza	70002163

2. Apellidos y Nombres, N° DNI y ORCID del asesor

Apellidos y Nombres	DNI	ORCID
Paniagua Segovia, Jesús Javier	28295100	https://orcid.org/0000-0002-7762-647X

3. Apellidos y Nombres de los Miembros del Jurado

- Dr. Arias Jara, Alfredo
- Dr. Mujica Lengua, Fidel
- Mg. Godenzi Vargas, Julio Pablo

4. URI

2.11.01 -- Alimentos y bebidas

URI: <https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.11.00>