

**DETERMINACIÓN Y AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA
EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES A PARTIR DE LA CÁSCARA DE
CACAO**

OSCAR JAVIER CARREÑO TOLEDO

COD: 2083689

LARRY YAIR DAVID ROJAS CORREA

COD: 2073495

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

**DETERMINACIÓN Y AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA
EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES A PARTIR DE LA CÁSCARA DE
CACAO**

OSCAR JAVIER CARREÑO TOLEDO

COD: 2083689

LARRY YAIR DAVID ROJAS CORREA

COD: 2073495

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título
de INGENIERO QUÍMICO**

Director

LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO

Ingeniero Químico

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FISCOQUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2014

DEDICATORIA

Esta tesis es el resultado de mucho esfuerzo y sacrificio que poco a poco logre alcanzar, así que primordialmente se la dedico a Dios quien siempre estuvo conmigo dándome fuerzas para salir adelante, guiándome siempre por el camino correcto.

A mis padres que son el motor de mi vida para seguir adelante, gracias a su esfuerzo por formarme como persona, a enseñarme que todo en la vida es posible cuando se hace con dedicación y sacrificio, por enseñarme que no se necesita ser adinerado para llevar a cabo nuestros sueños.

A mi hermano Rubén por ser el mejor hermano del mundo, por apoyarme y por ser enseñarme que con sacrificio se pueden cumplir nuestras metas, a mi hermanita Karen que con su ternura me ha enseñado que no se necesita riqueza para ser feliz.

A mi amigo Michel quien siempre fue una persona incondicional durante mi trayectoria en la universidad, el cual siempre estuvo apoyándome en los momentos más difíciles.

A mi compañero de tesis David quien siempre fue un gran amigo desde los inicios de mi carrera.

A mi novia Brenda, quien apareció en mi vida en un momento de tristeza dándome fuerzas para superar cada obstáculo y haciendo de mí una mejor persona, por su amor incondicional y su ayuda constante para llevar a cabo la culminación de esta nueva etapa de mi vida.

Oscar Javier Carreño Toledo

DEDICATORIA

Primeramente a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud, ser el manantial de vida y darme lo necesario para seguir adelante día a día para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi mamita Anita por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor. A mi papito Chepito por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanas Gloria, Bethi, Yolanda y Ximena por cada consejo puntual y oportuno que han sabido darme, por su apoyo incondicional, por ser mis amigas y mis confidentes. A mi tío Luis Antonio y su esposa Dorelly quienes depositaron su confianza en mí y me brindaron su ayuda cuando más lo necesité. A mi Sobrino Kevin quien con sus chistes y gran humor alegró mi estancia en Bucaramanga. A mi demás sobrinos Arley, Sharon y Nicolito quienes me motivan cada día para convertirme en su ejemplo a seguir.

A mi amada esposa Johanna que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amiga y compañera inseparable, fuente de calma y consejo en todo momento.

A mi compañero de tesis: Oscar Carreño (el gatico), por su apoyo, por haber formado un equipo de trabajo para lograr esta meta, por esas noches de desvelos, por haberme abierto las puertas de su casa y compartir su vida y la de su entorno y por ser mi mejor y único gran amigo durante mi carrera.

Larry Yair David Rojas Correa

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos por su apoyo y cooperación con las instalaciones, los equipos y los análisis fisicoquímicos realizados.

Al Dr. Luis Javier López Giraldo por su dirección y sus enseñanzas que enriquecieron nuestro desarrollo profesional.

A Said Toro y Mauren Estupiñán por el apoyo, dirección y acompañamiento en la realización de este proyecto, también por sus valiosas enseñanzas y consejos.

A Nuestros compañeros del grupo de investigación CICTA, en especial a Luis Carlos Rodríguez y Arley Villamizar por el apoyo que nos dieron.

A todos nuestros compañeros y amigos por los momentos compartidos durante los años en la universidad.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	30
1.1 REACTIVOS	30
1.2 EQUIPOS DE LABORATORIO	30
1.3 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA	31
1.4 INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOL OXIDASA	31
1.5 SECADO	32
1.6 DESLIPIDACIÓN	33
1.7 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO	33
1.8 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	33
1.9 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (PT)	34
1.10 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ELECCIÓN DE LAS VARIABLES DE DISEÑO	34
1.11 DISEÑO DE EXPERIMENTOS	35
1.12 PARÁMETROS CINÉTICOS A MODELOS AJUSTADOS	35
1.13 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	36
2. RESULTADOS Y ANALISIS	37
2.1 INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOLOXIDASA (PPO)	37
2.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE SECADO	38
2.3 ANALISIS BROMATOLÓGICO	40
2.4 CONDICIONES ÓPTIMAS Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS	41
2.5 EFECTOS DE LAS VARIABLES DE OPTIMIZACIÓN MÁS INFLUYENTES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (PT)	45
2.5.1 Efecto de la temperatura	45
2.5.2 Efecto relación etanol-agua (E/A)	45
2.5.3 Efecto del Ph	46
2.5.4 Efecto de la relación soluto: solvente (S:S)	46

2.6 COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES OBTENIDOS DE DIFERENTES MATRICES VEGETALES	47
2.7 EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES EXTRAIDOS A CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA HARINA DE CACAO DESENGRASADO (D) Y SIN DESENGRASAR (SD)	48
2.8 AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS	49
3. CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación general de los polifenoles	23
Figura 2. Estructura Química de los Flavonoides	24
Figura 3. (I) Principales monómeros de flavan-3-ol del cacao: (+) catequina; epicatequina; (II) polímeros de flavan-3-oles de cacao principales: (a-e): dímeros de procianidina B1, B2, B3, B4, B5, respectivamente; (f) trimer: procianidina C1; (g) tetrámero: procyanidin	26
Figura 4. Estructuras químicas de metilxantinas representativas de los granos del cacao	27
Figura 5. Diagrama de flujo que representa la Descripción metodológica	30
Figura 6. Lavado de mazorcas, eliminación de mucilago y corte en pedazos de aproximadamente 1 <i>cm</i> ³	31
Figura 7. Prueba cualitativa de la inactivación de la enzima PPO	37
Figura 8. Curvas de secado para los clones CCN-51 y THS-565	39
Figura 9. Superficie de repuesta de polifenoles totales clon TSH-565	44

LISTA DE GRAFICOS

	Pág.
Grafico 1. Diagrama de Pareto para el contenido de polifenoles totales CLON TSH-565	42
Grafico 2. Comparación del contenido de polifenoles totales obtenidos de la cáscara de cacao versus otra matrices vegetales	47
Grafico 3. Polifenoles totales obtenidos sobre la harina de la cáscara del cacao deslipidada, sin deslipidar, y sin deslipidar con ultrasonido del clon CCN-51	49

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Niveles de las variables evaluadas en el diseño de experimentos	35
Tabla 2. Modelos matemáticos	36
Tabla 3. Porcentajes de humedad de los clones estudiados	39
Tabla 4. Análisis bromatológico de las harinas de cacao estudiadas	40
Tabla 5. Diseño de experimentos y determinación de polifenoles totales para cada uno de los clones totales	41
Tabla 6. Constantes que determinan la función objetivo para la extracción de PT a partir de la cáscara de cacao	43
Tabla 7. Condiciones óptimas de extracción de polifenoles totales sobre la Cáscara de cacao	44
Tabla 8. Ajuste de parámetros cinéticos sobre los modelos preestablecidos	50

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO	61
ANEXO B. DIAGRAMA DE PARETOS PARA EFECTOS ESTANDARIZADOS	62
ANEXO C. GRÁFICAS DE SUPERFICIES DE RESPUESTA PARA LOS CLONES: CCN-51, FLE-3 E ICS-95	64

RESUMEN

TÍTULO: DETERMINACIÓN Y AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES A PARTIR DE LA CÁSCARA DE CACAO*

AUTORES: Carreño Toledo Oscar Javier
Rojas Correa Larry Yair David**

PALABRAS CLAVE: Cáscara de la mazorca de cacao, polifenoles, extracción sólido-líquido, cinética, harina.

DESCRIPCIÓN

Los polifenoles son compuestos con interés para las industrias alimentarias, farmacéuticas y cosméticas. Éstos se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal y por ende es posible extraerlos de diferentes matrices tales como las cáscaras de la mazorca de cacao. Sin embargo, para su extracción se debe de garantizar condiciones que favorezcan el rendimiento. Es así que en este trabajo se evaluó el efecto de la temperatura (T), la relación soluto solvente (SS), la relación etanol agua (EA) y el pH sobre la extracción sólido líquido cuantificada en términos de polifenoles totales (PT); para tal fin se empleó un diseño factorial 2^4 compuesto central rotatable mas puntos centrales con réplica y también se ajustaron los parámetros cinéticos del proceso. Este diseño se utilizó para evaluar las condiciones (T, pH, SS, EA) que maximizan la extracción de polifenoles de cinco diferentes clones de cacao (CCN-51, TSH-565, FLE-3, FSV-155, ICS-95).

A las mejores condiciones: temperatura: 60°C, relación etanol: agua 50:50 (v:v) y relación soluto solvente 1:60 (m:v) el contenido de polifenoles totales fue de 59,50, 98,30, 59,84, 65,84 y 93,81mgEAG/gms para los clones CCN-51, TSH-565, FSV155, FLE-3 e ICS-95 respectivamente.

Así mismo, se evaluaron distintos modelos matemáticos (Peleg, Peleg Modificado, logarítmico y Rakotondramasy) para describir el comportamiento cinético del proceso de extracción. De los modelos evaluados, el Peleg modificado fue el que describió con un mayor grado de ajuste ($R^2 = 99,05\%$) el proceso cinético para todos los clones evaluados. También se observó que el promedio para alcanzar el equilibrio es de 60 minutos, este proceso es relativamente rápido si se compara con otras matrices vegetales tales con la almendra de mango que alcanza el equilibrio a los 94 minutos Toro y Rosso (2011).

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química. Director. Luis Javier López Giraldo

ABSTRACT

TITLE: DETERMINATION AND ADJUSTMENT OF KINETIC PARAMETERS OF EXTRACTION TOTAL POLYPHENOLS FROM COCOA'S PEEL*

AUTHORS: Carreño Toledo Oscar Javier
Rojas Correa Larry Yair David**

KEYWORDS: Peel cob cocoa, polyphenols, extraction solid-liquid, kinetic, flour.

DESCRIPTION

Polyphenols are compounds that interest for the food, pharmaceutical and cosmetic industries. It is widely distributed in the plant kingdom and it is possible to extract from different matrices such as the peel of cocoa cob. However, extraction is necessary guarantee the conditions stimulate the production. This research appraised the effect of temperature (T), the relation solvent solute (SS), the relation ethanol water (EW) and pH on solid-liquid quantified extraction in terms of total polyphenols (PT) this purpose it was used a factorial 2^4 design central composite rotatable more central points replica also adjusted the kinetic parameters of the process. This design was used to evaluate the conditions (T, pH, SS, EA) to maximize the extraction of polyphenols from five different clones of cocoa (CCN-51, TSH-565, FLE-3 FSV-155 and ICS-95).

It determined spectrophotometrically the content of PT in the extract from peel of cocoa cob by the method Folin-Ciocalteu a 765 nm. The highest extraction was obtained by the TSH (98.30 milligrams equivalents of gallic acid / g dry acid) and was gotten under the following conditions: temperature: 60 ° C, relation ethanol: water 50:50 (v: v) and relation solute and solvent 1:60 (m: v).

Furthermore, it was studied the applicability of different mathematical models (Peleg, Modified Peleg, logarithmic and Rakotondramasy) in modeling extraction PT and finally model modified Peleg was chosen because it got a R^2 adjusted average of 99,05% for all clones. Furthermore this model showed that all the variables studied effect on concentration of PT. It was also observed that the average to get equilibrium is of 60 minutes, from the adjusted kinetic parameters is inferred that the extraction of polyphenols from the peel of cocoa cod is a rapid process when are with studies made using other types of wastes from the agro sector.

* WorkDegree

** Faculty of Physicochemical Engineering, Departament of Chemical Engineering. Director. Luis Javier Lopez Giraldo.

LISTA DE ABREVIATURAS

a,b,	Constantes del modelo logarítmico
AOAC	Association of official Analytical Chemist
CEq	Concentración de polifenoles totales en el equilibrio
C(t)	Concentración de polifenoles totales en el tiempo
EA	Relación etanol:agua
EAG	Equivalentes de Ácido
ICCO	International Cocoa Organization
LFI	Leatherhead Food International
K1	Constante del modelo de Peleg
K2	Contante de velocidad de Peleg
K3	Constante de capacidad de Peleg
K4	Constante de velocidad global
Pf	Porcentaje de humedad
PPO	Polifenol oxidasa

Pm	Peso de muestra inicial
Pms	Peso muestra seca
PT	Polifenoles totales
<i>R^r</i>	Coefficiente de correlación
SS	Relación soluto: solvente
t	Tiempo de extracción
T	Temperatura

INTRODUCCIÓN

El *theobroma cacao* L., nombre científico que recibe el árbol de cacao y que en griego significa “alimento de los dioses” , constituye una materia prima de gran importancia para las industrias de la chocolatería, confitería, cosméticos, productos farmacéuticos y más recientemente de los productos bioactivos; estos últimos con gran impacto positivo en la salud. Hoy en día, numerosas investigaciones corroboran todos los beneficios del cacao y hacen que la masificación de su consumo sea cada día más elevada. (Características de calidad del cacao de Colombia, 2013).

En Colombia, el cacao es uno de los productos que debido a sus condiciones de cultivo tiene excelentes posibilidades para convertirse en un cultivo competitivo desde el punto de vista agronómico, al tiempo que ayuda a conservar el medio ambiente ¹

El cacao es una fuente de sustento para muchas familias que cultivan y comercializan este producto. Según los datos reportados por la ICCO (International Cocoa Organization), para el 2013 Colombia alcanzó una producción anual de 48366 toneladas de cacao, dato que posiciona a Colombia en el quinto lugar a nivel de productores de cacao en América (ICCO, 2013). Se estima que aproximadamente 14 millones de personas en el mundo dependen de las plantaciones de cacao para su sustento². Por su parte, el cacao es un cultivo tradicional de economía campesina que demanda gran cantidad de mano de obra,

¹ Espinal, C. F., Martínez H. & Ortiz, L. 2005. *La Cadena Del Cacao En Colombia: Una Mirada Global de su Estructura y Dinámica 1991-2005*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia. Bogotá (Colombia), 51p.

² Argout, X., Fouet, O., Wincker, P., Gramacho, K., Legavre, T., Sabau, X, Lanaud, C. (2008). Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics*, 9, 512 – 530. doi: 10.1186/1471-2164-9-512.

de la cual se estima que viven 25000 familias en Colombia (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

En 2003 el cultivo generó 50854 empleos para cosechar un área de 99.975 hectáreas, participando con 3,8% y 4,4% del empleo requerido y de la superficie cosechada de cultivos permanentes, respectivamente, y con 2,9% y 2,5% del empleo y del área total cosechada, superando ampliamente el empleo requerido y el área dedicada a cultivos de banano, plátano y tabaco. Asimismo, durante 2003 contribuyó con el 1% del valor de la producción de la agricultura sin café y con el 0,9% de la actividad agrícola nacional (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2005).

Además, el cacao es uno de los cultivos más importantes con fines comerciales de varios países tropicales del mundo (ICCO, 2012). Asimismo, los granos de cacao son la materia prima para producir los polvos de cacao y su manteca, la cual es altamente utilizada por las industrias de la confitería y la cosmética. En la actualidad, la manteca de cacao es la tercera materia prima objeto de comercio en importancia después del azúcar y el café³.

En Colombia la producción de cacao en los últimos cinco años ha fluctuado entre 36000 a 42000 toneladas métricas, trayendo consigo un gran volumen de desechos los cuales para el 2010 ascendieron a 30.000 toneladas (FEDECACAO, 2013). Además, se tiene previsto aumentar el rendimiento de cultivo de 500 kilos por hectárea a 1200 kg para suplir las necesidades en las exportaciones⁴.

³ Argout, X., Fouet, O., Wincker, P., Gramacho, K., Legavre, T., Sabau, X.,...Lanaud, C. (2008). Towards the understanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataset of ESTs of *Theobroma cacao* L. generated from various tissues and under various conditions. *BMC Genomics*, 9, 512 – 530. doi: 10.1186/1471-2164-9-512.

⁴ Portafolio, 2014. Disponible en <<http://www.portafolio.co/archivo/documento/CMS7305529>>

En lo que respecta a los residuos, estos quedan generalmente acumulados en el cultivo, lo cual trae consigo grandes problemas ambientales a nivel de suelo por acumulación de materiales, los cuales finalmente se convierten en el sustrato idóneo para la proliferación y propagación de microorganismos patógenos para el cultivo⁵.

Entre los desechos generados se destaca la cáscara, la cual es la directamente responsable de la propagación de diferentes microorganismos patógenos (*i.e. Phytophoraspp Moniliophthoraroreri, Crinipellis perniciososa*) que son las causas principales de pérdidas económicas en la actividad cacaotera (Pinzón-Uzeche, 2012).

La cáscara de la mazorca de cacao es relativamente gruesa y encierra entre 20 y 50 semillas de cacao, ubicadas normalmente en cinco hileras y cubiertas por una pulpa mucilaginososa de color blanco y sabor azucarado⁶. El tamaño, la forma y el color de la cáscara de la mazorca del cacao, dependen del clon y cultivo.

La cáscara obtenida después de la cosecha de los granos representa en promedio el 66-75 % de la masa total cosechada⁷. Conscientes del alto volumen de residuos y el impacto que estos generan, el sector agrícola ha propuesto diferentes soluciones a la problemática del almacenamiento de los residuos generados por la producción del cacao, dichas soluciones van desde alimentar animales de granja hasta usar dicho desecho como materia prima, para el procesamiento de sales de potasio para la producción de jabón, sin embargo,

⁵ Parra, D. 1994. *Diagnóstico de enfermedades que afectan el cultivo del cacao en Barlovento y su comportamiento epidemiológico*. In: Taller Nacional de Cacao. Estación Experimental Miranda. Caucagua (Venezuela). Resúmenes, 21p.

⁶ Braudeau, J. 1970. El cacao. Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona, España. Editorial Blumé. 297 p.

⁷ Adziam, S.K and Asiam, E.K. Design of a cocoa pod splitting machine. Research journal of Applied Sciences, Engineering and Technology 2, 7: 622-634, 2010.

esas soluciones requieren superar dificultades como la baja digestibilidad en los animales y los pequeños porcentajes de potasio en la cacota de cacao⁸.

Además de los usos tradicionales mencionados en los párrafos anteriores, las cáscaras de cacao contienen sustancias antioxidantes, principalmente polifenoles. Según los datos de Leatherhead Food International (LFI), el mercado mundial de antioxidantes funcionales está aumentando de año en año en torno a un 3%, siendo valorado en el 2004 en 400 millones de dólares y en el 2007 en 438 millones de dólares. Europa, EE.UU., y Japón representan el 90% de este mercado. Además, los polifenoles son el 45% del mercado de antioxidantes funcionales, lo que equivale a casi 200 millones de dólares⁹. Así las cosas, la extracción de este tipo de compuesto se perfila como una opción para la valorización de este residuo.

En lo que respecta a los polifenoles, su interés en los últimos años se ha incrementado porque son múltiples los reportes en los cuales se evidencian sus propiedades antioxidantes y su capacidad de atrapar radicales libres, los cuales confieren propiedades asociadas con la prevención de enfermedades cardiovasculares, diversos tipos de cáncer y podrían ofrecer algún grado de protección contra el Alzheimer¹⁰.

Además, los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en la dieta, ya que la ingesta media está estimada en alrededor de 1g, lo cual supone 10 veces más que la ingesta de vitamina C, y 100 veces más que la vitamina E¹¹.

⁸ Mejía, L.A. & Argüello O. 2000. *Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao*. Publicaciones CORPOICA. Regional 7. Bucaramanga (Colombia), 140p.

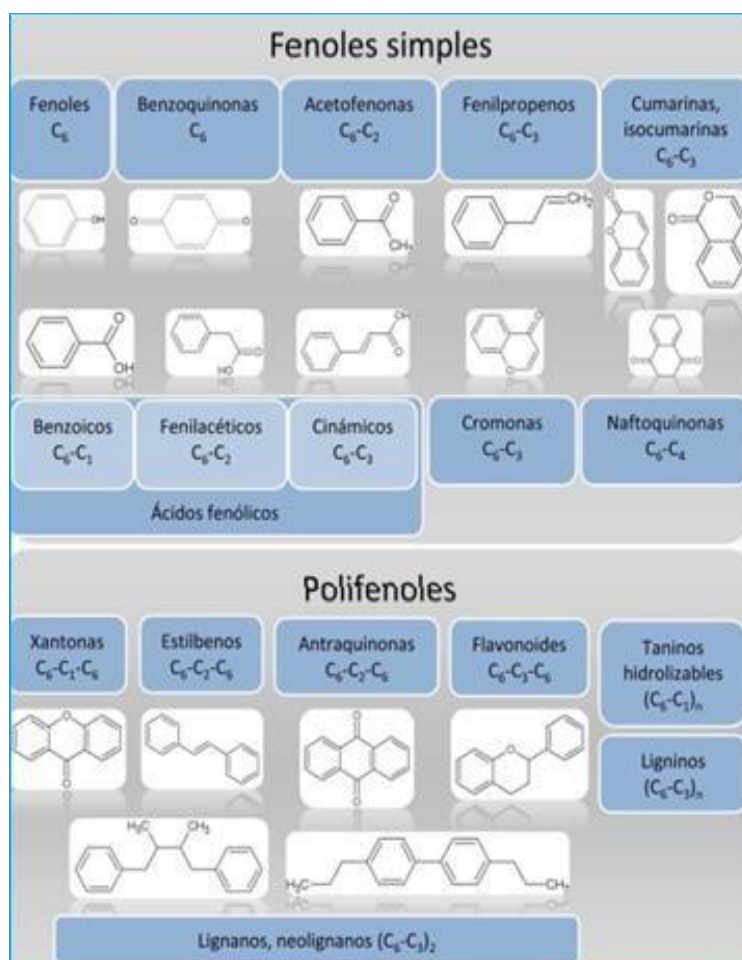
⁹ Nutrinat. Disponible en <http://www.nutrinat.com/actualidad-salud/suplementosnaturales/antioxidantes/antioxidantes-el-auge-de-los-polifenoles#.U8QJO_I5OAU>

¹⁰ Azadeh y Hermann, 2012. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls.

¹¹ Scalbert, A. and G. Williamson, 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130 (8s suppl.):2073s-2085s.

Los polifenoles están en las plantas como una combinación y no como componentes aislados pudiéndose clasificar de varias maneras, respecto a su unidad base o a la naturaleza de los grupos funcionales unidos a ésta (Figura 1). La más utilizada, es la clasificación (Figura 1) que los divide en ácidos fenólicos, flavonoides y los menos abundantes, estilbenos y lignanos, aunque hay muchos más tipos de estructuras¹².

Figura 1. Clasificación general de los polifenoles

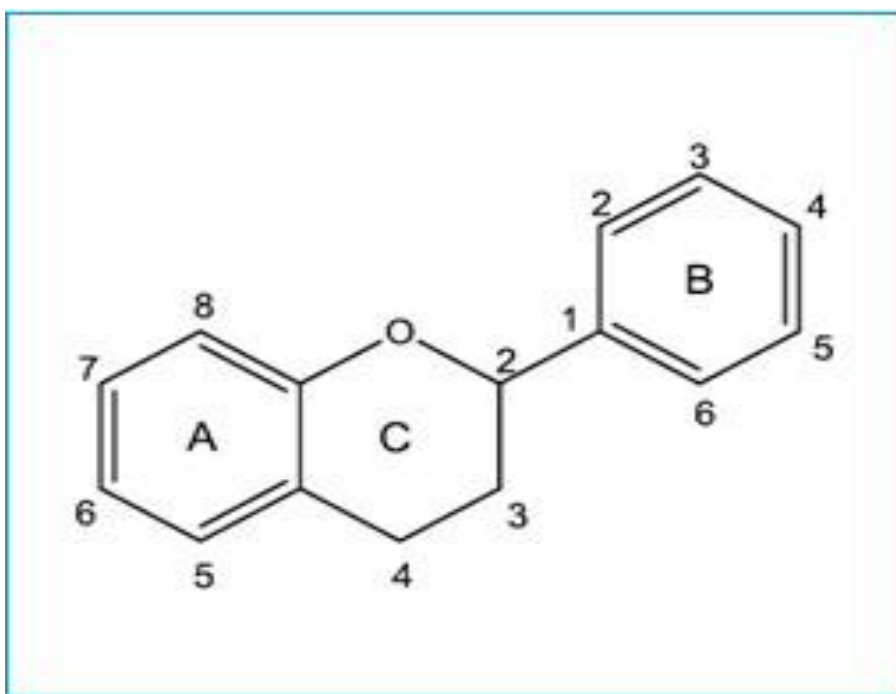


Fuente: Beltrán, Raúl. Caracterización de los Efectos Biológicos de los Polifenoles en la Inflamación y el Metabolismo, España, 2011, Trabajo de Doctorado. Universidad Rovira y Virgili. Facultad de Medicina.

¹² Beltrán, Raúl. Caracterización de los Efectos Biológicos de los Polifenoles en la Inflamación y el Metabolismo, España, 2011, Trabajo de Doctorado. Universidad Rovira y Virgili. Facultad de Medicina.

Los flavonoides son los compuestos polifenólicos de mayor presencia en las plantas y pueden ser clasificados como flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianinas y flavanoles (catequinas y procianidinas). Estos compuestos están caracterizados por una estructura benzo-pirona (C6-C3-C6). Esta estructura (Figura 2.) permite la sustitución en diversas posiciones de diferentes grupos funcionales como hidroxilos, metoxilos u O-glucosidos, lo que explica las más de 8000 estructuras caracterizadas hasta la fecha (Garcia y Castillo., 2008).

Figura 2. Estructura Química de los Flavonoides



Fuente. Perea-Villamil, Aide., Martínez-Guerrero, Nubia., Aranzazu-Hernández, Fabio., Cadena-Cala, Tatiana., (2013). Características de calidad del cacao de Colombia

Publicaciones más recientes como la de ¹³ muestran que los principales polifenoles presentes en granos de cacao son las catequinas y epicatequinas,

¹³ Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., & Williamson, G. Cocoa and health: A decade of research. *British Journal of Nutrition*, 99, 1–11, 2009. Corcuera L., Amézqueta S., Arbillaga L., Vettorazzi A., Touriño S., Torres J., López A. A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*. 2012, 50, 989–995.

además de las procianidinas (Figura 3) y las metilxantinas (Figura 4). Estas moléculas le confieren a los extractos de cacao las propiedades funcionales ^{14 15}.

En efecto, investigaciones como las de ^{16 17 18} y ¹⁹ han demostrado que los flavonoides y las metilxantinas presentes en el grano de cacao poseen características antioxidantes, anticancerígenas, antimicrobianas, vasodilatadoras, antiinflamatorias, y además estos compuestos posiblemente también reducen el riesgo de contraer enfermedades como el cáncer y de tipo cardiovascular.

¹⁴ Brunetto M., Gutiérrez L., Delgado Y., GAllignani M., Zambrano A., Gomez A., Ramos G., Romeroet C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*.2007, 100, 459 – 467.

¹⁵ Perea-Villamil, Aide., Martinez-Guerrero, Nubia., Aranzazu-Hernández, Fabio., Cadena- Cala, Tatiana., (2013). Características de calidad del cacao de Colombia

¹⁶ Martin M., Goya L., Ramos S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and chemical toxicology*.2013, 56, 336–351.

¹⁷ Corcuera L., Amézqueta S., Arbillaga L., Vettorazzi A., Touriño S., Torres J., López A.A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*.2012, 50, 989–995.

¹⁸ Zomer E., Owen A., Magliano D., Liew D., Reid C. The effectiveness and cost effectiveness of dark chocolate consumption as prevention therapy in people at high risk of cardiovascular disease: best case scenario analysis using a Markov model. *BMJ*. 2012, 344, 1-9.

¹⁹ Quiñones M., Miguel A., Muguera B., ALeixandrea D. Effect of a cocoa polyphenol extract in spontaneously hypertensive rats. *Food Funct*.2011, 2, 649.

Figura 3. (I) Principales monómeros de flavan-3-ol del cacao: (+) catequina; epicatequina; (II) polímeros de flavan-3-oles de cacao principales: (a-e): dímeros de procianidina B1, B2, B3, B4, B5, respectivamente; (f) trimer: procianidina C1; (g) tetrámero: procianidin

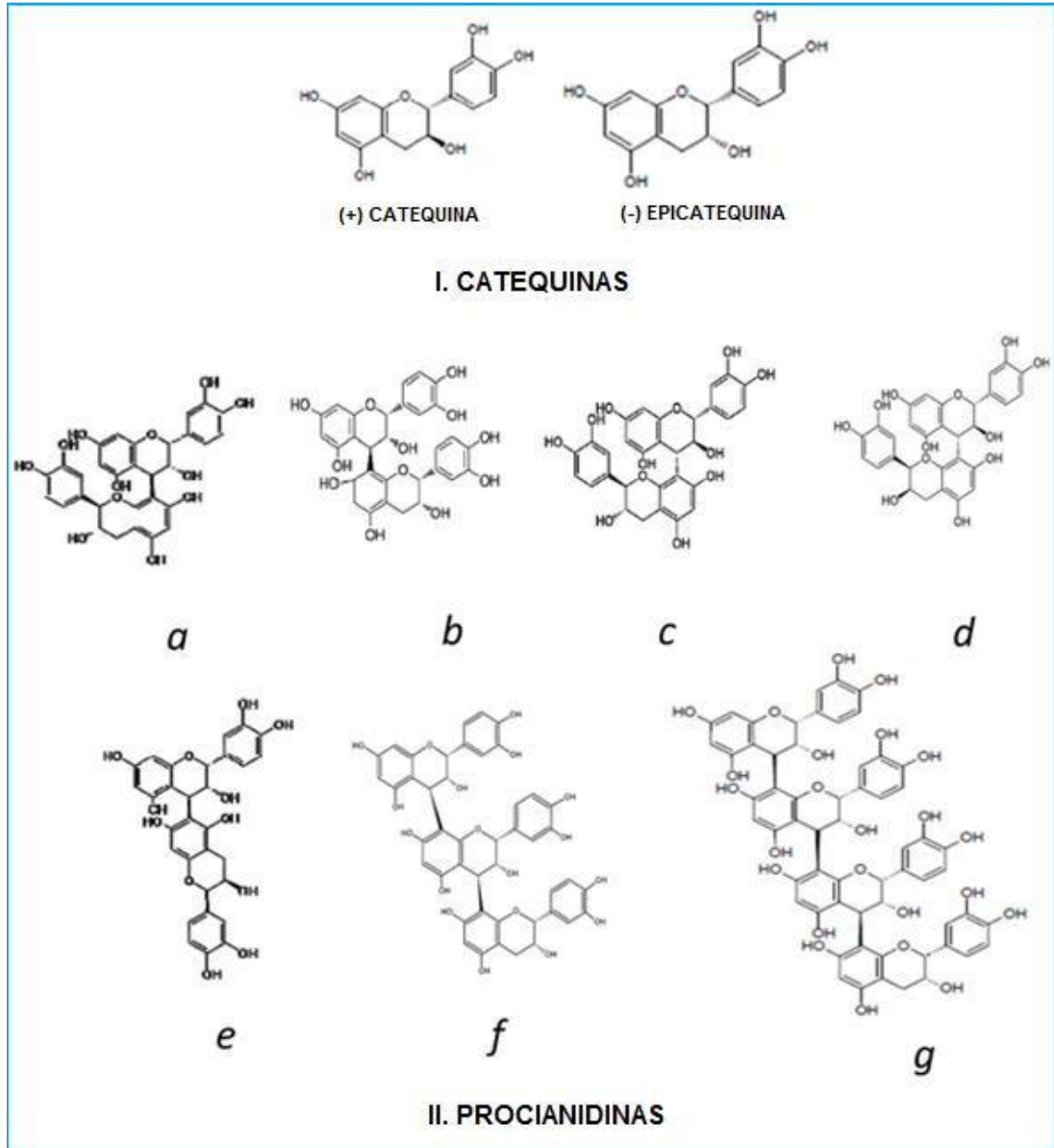
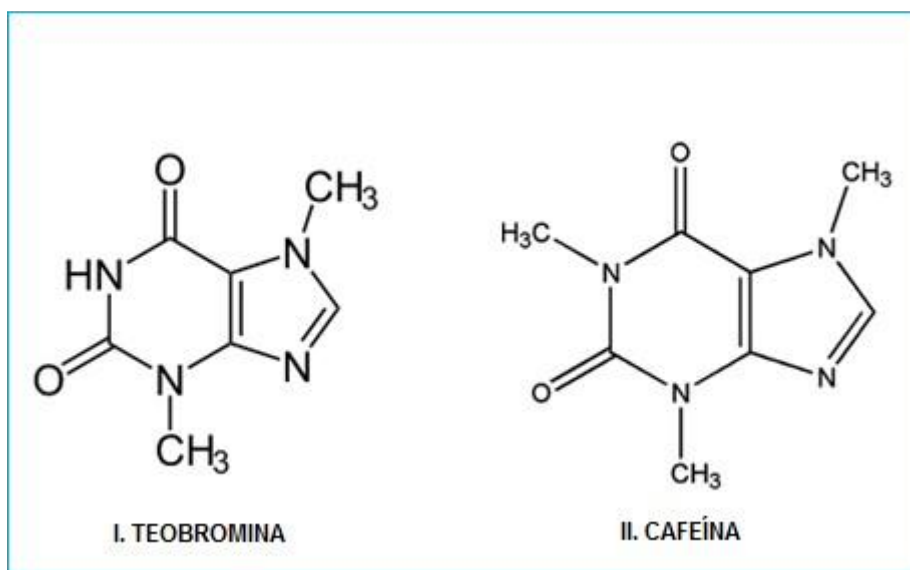


Figura 4. Estructuras químicas de metilxantinas representativas de los granos del cacao



Así mismo, se ha demostrado que el contenido de polifenoles en las matrices vegetales depende de la madurez en el momento de la cosecha del material, el procesamiento y el almacenamiento de la misma²⁰. La elaboración industrial de alimentos también afecta el contenido de los mismos²¹.

A pesar que los polifenoles pueden ser extraídos desde cualquier matriz vegetal, a lo mejor de nuestro conocimiento, no existen trabajos procedentes que busquen la optimización y determinación de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos desde la cáscara de cacao. Solo se conoce el trabajo de²² cuyos resultados muestran que es posible obtener extractos con contenidos de polifenoles que varían entre 352,67 y 365,33 mg/100g muestra.

²⁰ Van der Sluis, A.A., Dekker, M., de Jager, A., Jongen, W.M.F., 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3606-3613.

²¹ Vinson, J.A. and B.A. Hontz, Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J Agric Food Chem.* 43:401-403. 1995.

²² Martínez, R.; Torres, P.; Meneses, M.A.; Figueroa, J.G.; Pérez, Alvarez, J.A.; Viuda, Martos, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49, 39–45, 2012.

Sin embargo,²³ realiza la extracción sin hacer una selección rigurosa de los niveles de cada una de las variables que tienen un impacto sobre este tipo de procesos. En ese sentido son numerosos los autores que muestran que el pH, la relación soluto solvente, relación entre solventes y temperatura tienen un efecto sobre los rendimientos de extracción^{24 25 26 27 28}. Los autores concuerdan que en un rango de pH de 3-5 y temperatura entre 60 °C-90°C se obtiene un rendimiento de extracción que puede variar entre el 2,64 – 4,69%²⁹.

En vista de lo anteriormente mencionado, los extractos polifenólicos obtenidos a partir de la cáscara de la mazorca de cacao podrían convertirse en una opción viable para valorizar los residuos de la cosecha de este tipo de cultivo. En efecto, entre los nichos de mercado actuales la comercialización de productos de índole natural con propiedades específicas es de gran interés y de ahí la importancia de este proyecto que busca dar solución a dos problemáticas relacionadas con la salud y el aprovechamiento de los residuos sólidos. La solución presentada en este proyecto es implementar una técnica de extracción sólido-líquido para la extracción de polifenoles a partir de la cáscara de cacao.

²³ Martínez, R.; Torres, P.; Meneses, M.A.; Figueroa, J.G.; Pérez, Álvarez, J.A.; Viuda, Martos, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49, 39–45, 2012.

²⁴ HappiEmaga, T., Ronkart, S.N., Robert, C., Wathelet, B., Paquot, M. Characterisation of pectins extracted from banana peels (*Musa AAA*) under different conditions using an experimental design. *Food Chemistry*. 108, 463–471, 2008.

²⁵ Kalapathy, U., Proctor, A. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. *Food Chemistry*. 73, 393–396, 2001.

²⁶ Koubala, B.B., Kansci, G., Mbome, L.I., Crepeau, M.-J., Thibault, J.-F., Ralet, M.C. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Ameliorée” and “Mango” mango peels. *Food Hydrocolloids* 22, 1345– 1351, 2008.

²⁷ Levigne, S., Ralet, M.-C., Thibault, J.-F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. *Carbohydrate Polymers*. 49, 145–153, 2002.

²⁸ Pagan, J., Ibarz, A. Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. *Journal Food Engineering*. 39, 193–201, 1999.

²⁹ Barazarte, H.; Sangronis, E. and Unai, E. La cascara de cacao (*Theobroma cacao* L.): Una posible fuente comercial de pectinas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58, 64–70, 2008.

Para hacer esto posible, se cuantificarán los polifenoles presentes en la cáscara de la mazorca del cacao de cinco variedades de cacao y se implementará una técnica de extracción sólido líquido, en la que el objeto del estudio será determinar las mejores condiciones de extracción evaluando el efecto de la temperatura, pH, relación de solventes y relación soluto solvente, ya que estas son las variables más significativas en la extracción de polifenoles ³⁰ Pinelo *et al.*, 2004). La experimentación y evaluación del efecto de cada uno de los factores mencionados, se llevará a cabo empleando un diseño factorial 2⁴ compuesto central rotatable + puntos centrales y el análisis de los resultados se efectuará por el método de superficie de respuesta, empleando como variable de respuesta la concentración de polifenoles totales. Además se ajustarán los parámetros cinéticos para el proceso de extracción.

Cabe resaltar que los resultados parciales del trabajo realizado fueron presentados en el Seminario Internacional de Cacao y Chocolate “Nuevos retos en calidad”.

La ejecución de este trabajo formó parte del proyecto *“Extracción, ajuste de parámetros cinéticos y caracterización de polifenoles y de lípidos obtenidos a partir de subproductos de la filial cacao (cáscara de cacao)”*, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural CENIREC y desarrollado por el Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos-CICTA de la Universidad Industrial de Santander.

³⁰ Chirinos, R.; Ruez, H.; Campos.; Pedreschi, R. Y Larondelle, y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compound from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. En: Separation and Purification Technology. Vol.55, 2007; p.217-225.

1. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

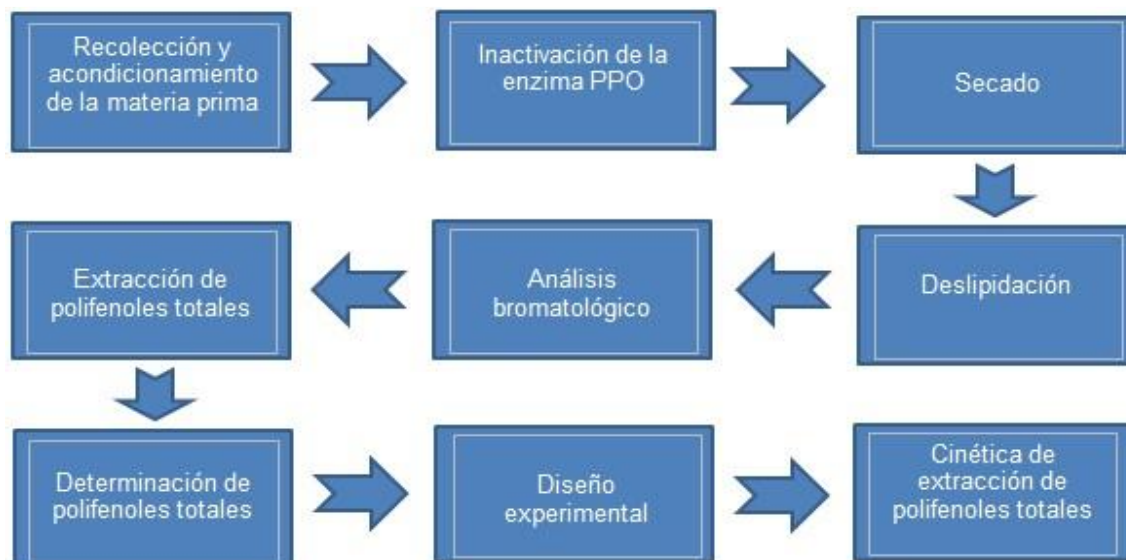
1.1 REACTIVOS

Para el desarrollo del proyecto se emplearon: n-hexano, etanol, ácido acético, ácido gálico, carbonato de sodio, reactivo de Folin Ciocalteu y agua destilada. Todos los reactivos fueron de grado analítico y adquirido en SIGMA-ALDRICH.

1.2 EQUIPOS DE LABORATORIO

Se utilizaron los siguiente equipos: balanza analítica AB204-S marca Metler Toledo, espectrofotómetro Genesys 20 marca ThermoSpectronic, baño ultrasónico marca Elmasonic E., molino de aspas standardmodel No. 3 marca Thomas WileyMill, molino de anillos, tamizador portable modelRx 24 marca SieveShaker, malla No. 120 marca Usa Standard TestingSieve, centrífuga HeraeusMegafuge 16R marca Thermo Fisher Scientific, placa de calentamiento MR Hei-Tec marca Heidolp, Ph metro marca SchottGerate, microcentrífuga marca 1-14 marca Sigma.

Figura 5. Diagrama de flujo que representa la Descripción metodológica



1.3 RECOLECCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MATERIA PRIMA

Se recolectaron 5 tipos de clones de mazorca de cacao provenientes de la finca Villa Mónica ubicada en el municipio de San Vicente de Chucurí, Santander. Por clon se recibieron 15 mazorcas las cuales fueron puestas a disposición de trabajo según su grado de madurez. Después de la recepción, las mazorcas fueron lavadas meticulosamente con un cepillo de cerdas plásticas en una solución acuosa al 0,5% (v/v) de hipoclorito de sodio. Luego, las mazorcas fueron cortadas quitando respectivamente todo su mucílago y dejándolas en pedazos de aproximadamente 1 cm^3 (Figura 6.)

Figura 6. Lavado de mazorcas, eliminación de mucílago y corte en pedazos de aproximadamente 1 cm^3



1.4 INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOL OXIDASA

La activación de la enzima polifenol Oxidasa es ocasionada por el incremento en la temperatura y por el cambio en las condiciones de pH que ocurren durante los procesos de fermentación y secado. Como consecuencia de la activación de la enzima, en presencia de oxígeno, ocurre la oxidación de los flavonoides trayendo

consigo la disminución del contenido de polifenoles totales en cáscara del cacao³¹.

Por lo tanto, se llevó a cabo la inactivación de la enzima siguiendo el método propuesto por³². Brevemente se tomaron 4 patrones de muestra cáscara de cacao, de las cuales tres se trataron con una solución de ácido ascórbico a una concentración de 0,2% (p/v) y temperatura de 95 °C, variando el tiempo de contacto con la muestra de 1, 3 y 5 minutos y la cuarta muestra se trató sólo con agua a 95 °C durante 5 minutos. Luego se aplicaron 3 gotas de solución de catecol 1:10 v/v a cada muestra y se dejó reaccionar durante 10 minutos, Después de este tiempo se observó el grado de pardeamiento de las muestras, que se relaciona directamente con la actividad de la PPO.

1.5 SECADO

Cada una de las muestras fueron secadas empleando un horno de bandejas con recirculación de aire a 50°C, hasta alcanzar peso constate siguiendo la metodología propuesta por Pitchaon y Gordon, (2009). Seguidamente la materia prima seca fue molida empleando un molino de aspas y un molino de anillos, esto con el objeto de obtener un tamaño de partícula de 0,125mm ya que es el valor optimizado por³³. Finalmente, a la harina de cáscara de cacao se le determinó el contenido de humedad siguiendo el método estandarizado por la norma internacional A.O.A.C 7.003/84 y 930.15/90. Lo anterior se realizó con el propósito de calcular el contenido de polifenoles totales de la harina de la cáscara de la mazorca de cacao en base seca.

³¹ Misnawi J., Bakar J., Saari N. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *J. ScifoodAgric.* 2002, 82, 559-556.

³² Tomas-Barbern F., Cinefuegos E., Marn A., Muguerza B., Gil A., Cerd B., Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Ibarra A., Pasamar M., Ramn D., ESPN J. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoids monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 3926-3935.

³³ Giao, M., Pereira, C., Fonseca, S., Pintado, M., Malcata, F. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *agrimoniaeupatoria*, *Salvia sp.* and *Satureja Montana*. En: *Journal of food Chemistry*. Vol. 117 (2009) p. 412-416.

1.6 DESLIPIDACIÓN

El proceso de desengrasado se desarrolló con la metodología de³⁴, inicialmente se tomaron 3g de harina y se mezclaron con 30 ml de n-hexano, pasando luego por un ultrasonido durante 15 minutos a 30 °C. Luego se centrifugó la solución a 3.500 rpm durante 15 minutos a 25 °C. Al finalizar el centrifugado se retiró el sobrenadante. Este proceso se repitió por duplicado. Al final la muestra se dejó secar por si sola evitando contacto directo con la luz.

1.7 ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Se realizó un análisis fisicoquímico a la harina de la mazorca de la cáscara de cacao deslipidada y, sin deslipidar, y al retenido, producto del tamizado en la etapa de molienda, descrito en la sección 2.5. Cabe resaltar que dicho análisis se realizó por triplicado. Los métodos utilizados en este análisis fueron los estandarizados: AOAC 923.03 para determinar la ceniza, AOAC 920.87 para determinar la proteína, AOAC 920.85 para determinar la grasa, AOAC 925.1 para determinar la humedad, y AOAC 930.20 para determinar la fibra cruda. En lo que respecta al pH inicial de la harina de cáscara de la mazorca de cacao se utilizó el método AOAC 943.02

1.8 EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

El material procedente de la etapa anterior se sometió al proceso de extracción según la metodología de³⁵, donde el material sin deslipidar se mezcló con 50 ml de solución etanol/agua, ajustando a su vez el pH con ácido acético y

³⁴ Cadena, T.; Herrera, J. Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia, 2008.

³⁵ Tan, P. W.; Tan, C.P. Yho, C.W. Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centella asiatica*). International Food Research Journal. 18, 557-562, 2011.

calentándolo a un determinada temperatura durante una hora, todo esto siguiendo el diseño de experimentos descrito en la sección 2.11. Luego la solución se centrifugó a 3500 pm durante 15 minutos a temperatura de 25 °C. Al final se retiró el sobrenadante y se almacenaron las muestras en viales color ámbar. Todo este proceso se realizó por duplicado.

1.9 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (PT)

El contenido de polifenoles totales se determinó siguiendo la metodología de³⁶. Se tomaron 50 µl de muestra a valorar, luego se mezclaron vigorosamente en un tubo de ensayo con 1,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu 1/10 p/v. Al cabo de 5 minutos se adicionaba 1,5 ml de carbonato de sodio 7,5% p/v.

Seguidamente, la solución se deja en reposo durante 60 minutos. Luego la absorbancia de las muestras fue leída a 765 nm. El contenido de polifenoles totales fue calculado mediante la Ecuación 1 y expresado en mg Equivalentes de Ácido Galico (mgEAG) por gramos de muestra seca (gms). La solución de referencia fue ácido gálico. Anexo 1.

$$PT \frac{mgEAG}{gms} = \frac{(abs \text{ muestra} - intercepto)}{pendiente} \quad \text{Ecuación 1.}$$

1.10 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ELECCIÓN DE LAS VARIABLES DE DISEÑO

Las variables de diseño que se seleccionaron fueron a) temperatura, b) relación soluto-solvente, c) relación etanol-agua y d) pH debido a que estos son lo que

³⁶ Perea, J., Cadena T., Herrera J. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud UIS*.2009, 41,128-134. PinzónUseche José Omar.2012. *Manejo fitosanitario del cultivo de cacaoTheobromacacaoL – medidas para la temporada invernal*. ICA - Federación Nacional de Cacaoteros. Bogotá (Colombia), 43 p.

tienen mayor influencia en el proceso de extracción^{37 38} (Yit-TzuChen *et al.*, 2007),³⁹ .

1.11 DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Para establecer las condiciones óptimas que maximicen la extracción de polifenoles a partir de la cáscara de cacao se realizó por duplicado, un diseño factorial 2⁴ compuesto central rotatable + puntos centrales, empleando para su análisis la metodología de superficie de respuesta utilizando como variable de respuesta la concentración de polifenoles totales, en la Tabla 1 se muestra los niveles de las variables evaluadas. El software utilizado fue STATISTICA 7 versión prueba.

Tabla 1. Niveles de las variables evaluadas en el diseño de experimentos

Factor	pH		T		S:S		E:A	
Nivel	-	+	-	+	-	+	-	+
Valor	4	6	20	60	0,00834	0,04166	0	100

1.12 PARÁMETROS CINÉTICOS A MODELOS AJUSTADOS.

La Tabla 2 muestra modelos que se evaluarán para el ajuste cinético del proceso de extracción.

³⁷ Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, Y Velic, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenol from grape seeds. En. Journal of foodEngineering. Vol.81, (2007); p.236-242.

³⁸ Azizah, A., Nick, M., Swee, Tee. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products.1998. p; 199-202.

³⁹ Arabshahi, S., Devi, V., Urooj, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability.2005.p; 1100-1105

Tabla 2. Modelos matemáticos

Modelo	Ecuación	Parámetros
Peleg	$C(t) = \exp(K1*t^n)$	K1,n: constantes de Peleg
Peleg modificado	$C(t) = \frac{t}{K2 + K3*t}$	K2: relacionada con la velocidad de extracción
		K3: relacionada con la concentración máxima de PT
Logarítmico	$C(t) = a \log(t) + b$	a,b: constante del modelo logarítmico
Rakotondramasy	$K4t = \ln\left(\frac{C_{eq}}{C_{eq} - C(t)}\right)$	K4: constante de velocidad global (1/min)

Fuente: Bucic-Kojic et al., (2007)

1.13 CINÉTICA DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Se tomaron aproximadamente 4,2 g de harina de cáscara de cacao por clon, se disolvió en 250ml de solución etanol/agua, luego se procedió a estabilizar el pH usando ácido acético en constante agitación, la extracción inició cuando la unidad extractora (balón de 500 ml) este a las condiciones óptimas obtenidas según el procedimiento descrito en la sección 1.11. Después de alcanzar las condiciones de operación se procede a tomar 21 alícuotas, cada una de 400 µL de la solución (procurando que la toma de la alícuota no dure más de 5 segundos).

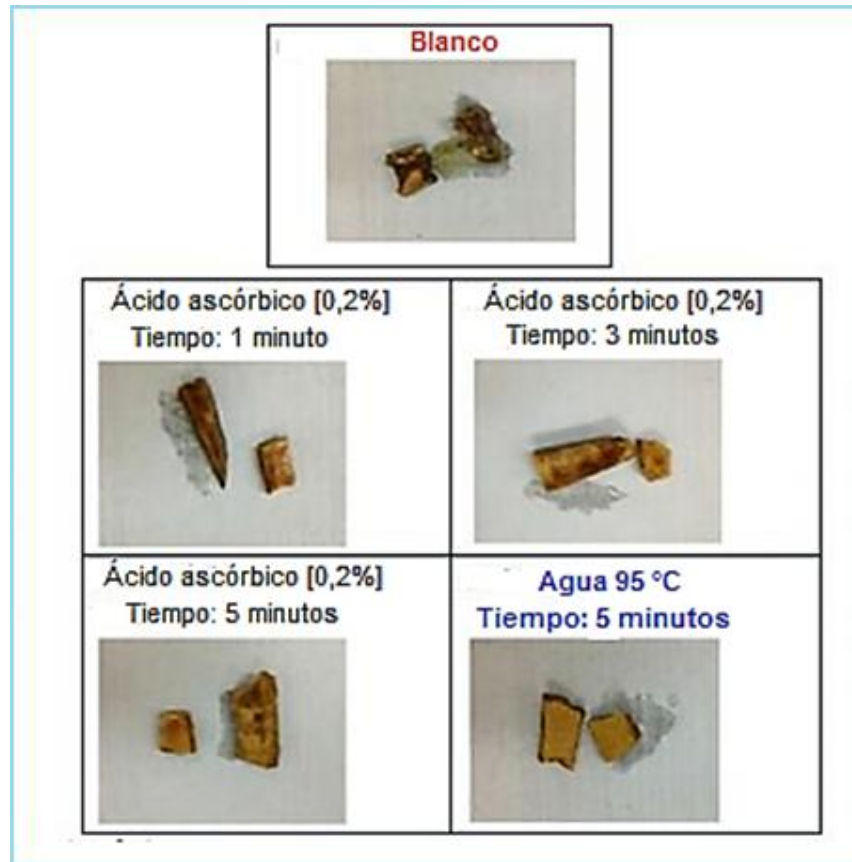
La toma de las alícuotas se hará de la siguiente manera: durante los primeros 10 minutos se tomará una alícuota por minuto, la siguiente hora se tomará 1 alícuota cada 10 minutos y completada dicha hora, se procederá a tomar alícuotas cada media hora hasta completar cuatro horas, inmediatamente después de tomada la alícuota se procede a envasarla en un tubo eppendorf y guardarla a cinco grados Celsius hasta el análisis de polifenoles totales.

2. RESULTADOS Y ANALISIS

2.1 INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOLOXIDASA (PPO)

De acuerdo con el grado de pardeamiento obtenido en cada uno de los ensayos (Figura 7), se concluye que el proceso de inactivación con agua a 95°C y un tiempo de contacto de 5 minutos es el más efectivo. En efecto, en la Figura 7 se aprecia claramente que la muestra sujeta a este análisis es la que menor grado de pardeamiento presenta, lo que es un indicativo cualitativo de la inactivación de la PPO. Además este tratamiento será el más sencillo de implementar y el que menor costo asociaría en el caso de llevarse a cabo el proceso a una mayor escala.

Figura 7. Prueba cualitativa de la inactivación de la enzima PPO



2.2 DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE SECADO

Se tomaron 38 cajas de Petri en las cuales se pesaron aproximadamente 2g de muestra, luego se ingresaron al horno y se retiró muestra por muestra durante la primera hora cada 5 minutos, durante la segunda hora cada 15 minutos y de ahí en adelante cada hora hasta cumplir las 24 horas de proceso, el porcentaje de humedad se calculó, se tabuló y se construyeron las curvas de cinética por medio de la Ecuación 2.

$$100 - \left(\frac{Pm - Pms}{Pm} * 100 \right) = Pf \quad \text{Ecuación 2.}$$

Pm: peso inicial de la muestra, Pms: peso de la muestra del horno y Pf: porcentaje de humedad. El porcentaje de humedad fue tabulado con el fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar peso constante. Los resultados se observan en la Figura 8 en la cual se puede apreciar que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es de 6 horas para los clones CCN-51 y TSH-565. Estos resultados permiten inferir que sin importar el clon, las cinéticas de secado tienen un comportamiento similar.

Este proceso se repitió para las cáscaras de los clones FLE-3, FSV-155 e ICS-95 corroborándose que estos últimos tienen el mismo comportamiento. En promedio las cáscaras de cacao tienen una humedad inicial y final de $94,10 \pm 2,23$ %, y $11,91 \pm 1,77$ % respectivamente. Así mismo el tiempo promedio con el que se garantiza el secado de las cáscaras de cacao es de aproximadamente 7 horas (Tabla 3).

Figura 8. Curvas de secado para los clones CCN-51 y TSH-565

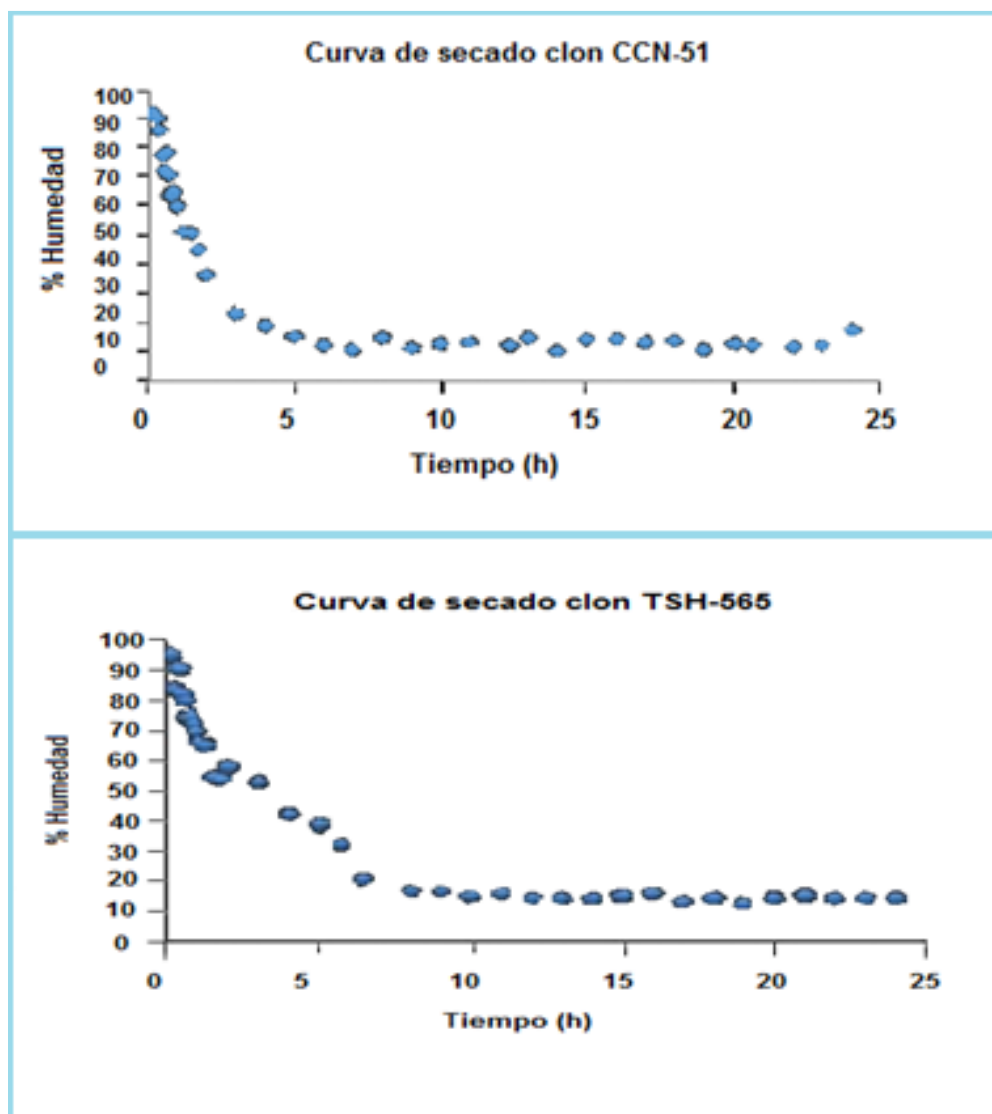


Tabla 3. Porcentajes de humedad de los clones estudiados

Clon	CCN-51	TSH-565	FLE-3	ICS-95	FSV-155	VALOR MEDIO
Humedad inicial	91,6	93,64	97	92,56	95,7	94,10±2,23
Humedad final	12,72	11,02	10,88	10,29	14,62	11,91±1,77
Tiempo de equilibrio	6 h	6 h	7 h	9 h	9 h	7 h

2.3 ANALISIS BROMATOLÓGICO

Los resultados del análisis bromatológico realizado a las harinas de cáscara de cacao de los 5 clones (Tabla 4), permiten concluir que no existen diferencias significativas entre la materia prima deslipidada y sin deslipidar respecto a la grasa.

Por lo tanto, se puede inferir que la grasa no constituirá una barrera de transferencia de masa al momento de la extracción de polifenoles y por lo tanto, la etapa de deslipidado se podrá omitir del proceso.

Tabla 4. Análisis bromatológico de las harinas de cacao estudiadas

Clon	Parámetro	Humedad	Ceniza	Valor calórico	Proteína	Fibra cruda	Carbohidratos totales	Grasa
CCN-51	Deslipidado	5,87±0,3	6,51±0,01	352,53	4,89±0,05	33,79±0,1	82,32	0,41±0,01
	Sin deslipidar	9,97±0,3	7,47±0,01	332,34	5,42±0,05	20,87±0,1	76,72	0,42±0,01
TSH-565	Deslipidado	6,57±0,3	6,07±0,01	352,74	5,12±0,05	21,91±0,1	81,58	0,66±0,01
	Sin deslipidar	8,51±0,3	5,88±0,01	344,74	4,78±0,05	30,16±0,1	80,37	0,46±0,01
ICS-95	Deslipidado	6,86±0,3	7,82±0,01	343,03	7,27±0,05	11,66±0,1	77,7	0,35±0,01
	Sin deslipidar	5,72±0,3	7,74±0,01	352,21	7,19±0,05	11,90±0,1	78,14	1,21±0,01
FSV-155	Deslipidado	8,73±0,3	6,72±0,01	341,25	7,66±0,05	11,79±0,1	76,28	0,61±0,01
	Sin deslipidar	7,08±0,3	6,96±0,01	351,99	7,70±0,05	14,10±0,1	76,63	1,63±0,01
FLE-3	Deslipidado	6,22±0,3	8,48±0,01	342,8	4,81±0,05	12,65±0,1	80,17	0,32±0,01
	Sin deslipidar	5,90±0,3	7,77±0,01	347,97	4,26±0,05	15,24±0,1	81,54	0,53±0,01
Valor medio		7,04±1,2	6,83±1,0	347,4±6,8	5,75±1,5	21,80±9,1	79,77±2,8	0,59±0,3

2.4 CONDICIONES ÓPTIMAS Y DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Para determinar las condiciones óptimas se realizó por duplicado un diseño factorial 2⁴ compuesto central rotatable + puntos centrales para los 5 clones tratados. En la Tabla 5 se tabulan las variables evaluadas, sus niveles y la concentración de polifenoles totales obtenida en cada punto experimental.

Tabla 5. Diseño de experimentos y determinación de polifenoles totales para cada uno de los clones totales

Tabla (I). Diseño de experimentos y polifenoles totales expresados en mgEAG/gms para cada punto experimental de los clones de cacao								
T [°C]	pH	E:A v/v	S:S p/v	Polifenoles Totales [mgEAG/gms]				
				CCN-51	TSH-565	FSV-155	FLE-3	ICS-95
20	5	50/50	1/40	33,01±1,29	50,98±0,03	17,55±0,61	52,47±1,67	59,06±0,59
30	4	25/75	1/60	36,44±1,79	42,63±0,15	17,09±0,60	27,38±0,91	33,77±3,12
30	4	25/75	1/30	29,36±0,86	36,50±0,70	11,98±1,20	18,17±1,89	41,32±2,62
30	4	75/25	1/60	31,27±1,74	46,16±0,18	18,38±1,15	25,69±0,97	52,36±0,49
30	4	75/25	1/30	29,24±0,08	39,90±1,46	14,64±0,26	20,42±0,21	41,09±0,55
30	6	25/75	1/60	38,58±0,60	44,93±0,45	15,17±0,76	25,53±0,89	49,52±1,68
30	6	25/75	1/30	34,81±0,24	62,26±0,52	5,99±0,32	19,92±1,30	43,78±1,27
30	6	75/25	1/60	27,95±0,57	43,24±0,32	12,59±1,27	23,92±0,40	37,97±1,00
30	6	75/25	1/30	21,83±1,89	35,57±0,28	11,00±0,21	19,57±0,04	32,12±0,14
40	4	50/50	1/40	46,61±0,81	59,51±0,20	25,53±1,47	34,35±2,07	64,44±0,35
40	5	0/100	1/40	20,59±0,31	29,36±0,44	3,51±1,28	19,53±0,25	60,93±3,90
40	5	50/50	1/120	55,60±0,71	74,77±0,29	57,19±1,58	44,34±2,34	86,45±0,48
40	5	50/50	1/40	46,20±0,41	62,07±0,79	27,08±0,94	33,85±0,06	68,11±0,70
40	5	50/50	1/40	44,70±0,73	60,76±0,31	46,05±1,66	32,57±0,78	67,54±0,33
40	5	50/50	1/40	45,00±0,12	61,98±0,12	26,48±0,51	32,34±0,35	64,32±1,10
40	5	50/50	1/40	44,94±1,33	61,39±0,53	25,73±1,30	36,22±0,25	61,50±0,62
40	5	50/50	1/24	37,43±0,07	68,66±1,07	40,38±0,03	31,51±0,19	42,36±0,13
40	5	100/0	1/40	0,83±0,07	4,66±0,29	7,79±0,28	4,61±0,16	7,33±1,13
40	6	50/50	1/40	41,92±1,92	60,88±0,78	36,79±0,60	64,11±0,97	60,60±1,68
50	4	25/75	1/60	47,88±1,21	65,25±0,12	39,21±2,03	53,86±0,63	66,55±1,76
50	4	25/75	1/30	43,53±0,91	41,05±2,97	26,87±6,48	42,12±0,15	44,25±0,24
50	4	75/25	1/60	40,85±1,69	59,20±0,40	40,89±5,94	57,06±0,70	65,10±3,05
50	4	75/25	1/30	33,55±0,21	47,33±0,93	35,38±1,35	44,80±1,66	50,90±0,24
50	6	25/75	1/60	38,91±1,63	69,74±0,37	29,90±3,38	36,54±0,15	67,99±2,89
50	6	25/75	1/30	34,36±0,16	35,98±0,72	17,17±0,33	41,09±0,34	28,54±0,64
50	6	75/25	1/60	32,86±2,63	49,43±0,81	57,13±0,70	48,43±0,55	50,31±3,72
50	6	75/25	1/30	28,46±0,18	51,13±1,26	35,79±0,86	40,73±1,25	40,59±1,61
60	5	50/50	1/40	50,00±0,82	67,37±0,68	36,43±1,03	61,06±0,25	64,59±0,23

Los resultados experimentales fueron analizados aplicando el análisis de varianza ANOVA en el software STATISTICA (versión de prueba). El objetivo de este análisis es el de determinar cuáles de las variables evaluadas (relación soluto solvente (SS), relación etanol/agua (E/A), pH (pH) y temperatura (T)) y sus interacciones, tienen una significancia mayor al 95% ($p > 0,05$) para explicar el comportamiento de la extracción de polifenoles.

En el grafico 1 muestra el diagrama de Pareto par el THS-565, los demás análisis se encuentran en el Anexo 2. De acuerdo con el clon estudiado, las variables con mayor significancia son: Clon **CCN-51**(E/A)², (T)(pH), (T)²,(pH)², (pH)(E/A)². Clon **TSH-565** (E/A)², (T)(pH), (T)², (pH)², (pH)(E/A). Clon **FSV-155** (E/A)², (SS), (SS)², (E/A), (T)(E/A). Clon **FLE-3** (T), (E/A)², (T)², (SS). Clon **ICS-95** (E/A)², (SS), (E/A), (pH)², (T), (T)(SS), (pH)(E/A)

Grafico 1. Diagrama de Pareto para el contenido de polifenoles totales CLON TSH-565



Una vez identificadas las interacciones relevantes se procedió a realizar el ajuste a polinomios de segundo orden. Las ecuaciones ajustadas para cada uno de los clones corresponden a la siguiente ecuación general (Ecuación 3) y los valores de las constantes se muestran en la Tabla 6.

ECUACIÓN 3. Función objetivo para la determinación de polifenoles totales a partir de la cáscara de cacao.

$$PT \left[\frac{mgEAG}{gms} \right] = A + B(EA) + C(T) + D(pH) + E(SS) + F(T)(pH) + G(pH)(EA) + H(EA^2) + I(T^2) + J(pH^2) + k(SS^2) + L(pH)(SS) + M(EA)(SS) + N(T)(EA) + O(T)(SS) \text{ (Ecuación 3).}$$

Tabla 6. Constantes que determinan la función objetivo para la extracción de PT a partir de la cáscara de cacao

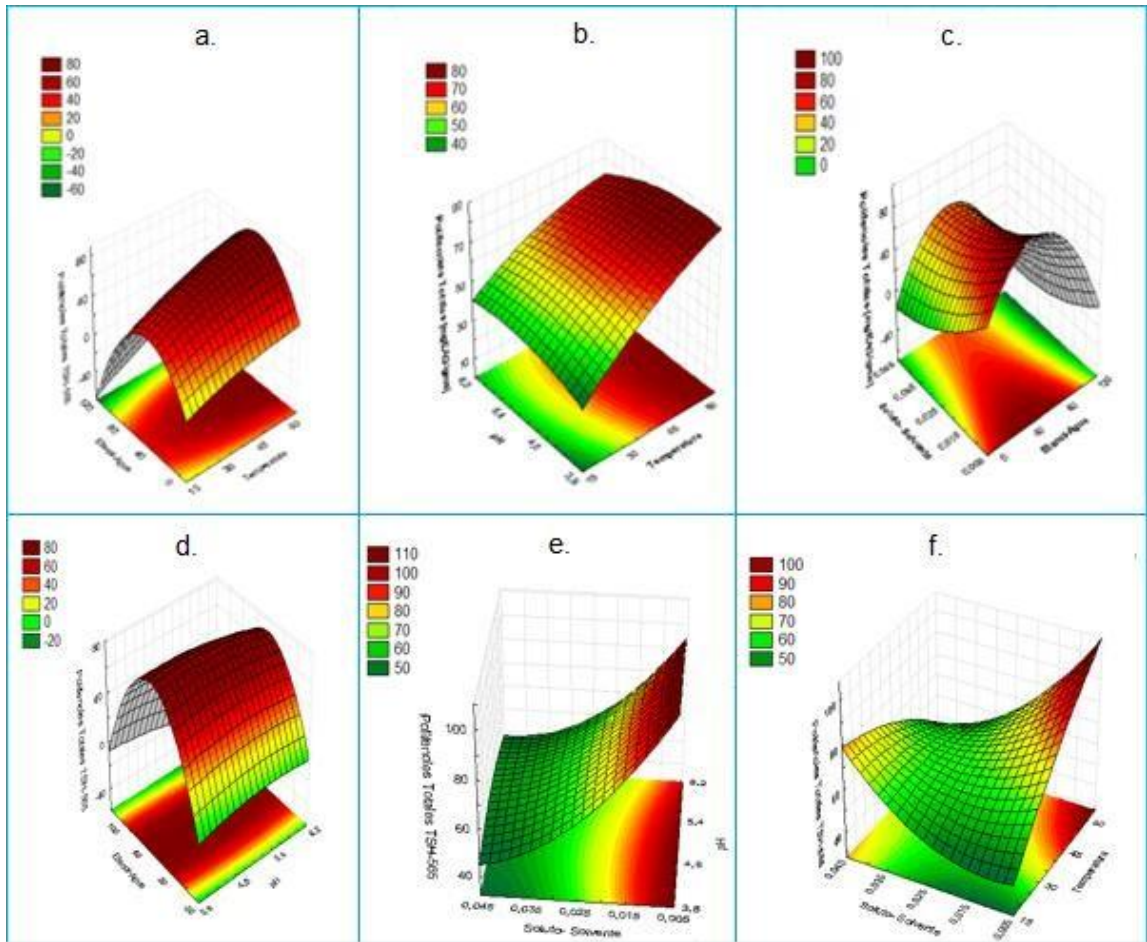
Clon	CONSTANTES															R ²
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
FLE-3	74,21	0,93	-1,77	-10,5	-730	-0,18	0	-0,01	0,04	1,22	-8287	190,3	-227	0	0	0,73
ICS-95	-332	1,6	4	105,9	2292	-0,2	-0,1	0	0	-9	-12678	-154	5,7	0	-52,8	0,78
CCN-51	-71,3	1,4	2,06	21,78	-572	-0,17	-0,03	-0,01	-0,01	-1,56	0	0	0	0	0	0,97
TSH-565	-148	1,88	2,94	47,72	-1448	-0,18	-0,1	-0,02	-0,01	-3,96	0	0	0	0	0	0,88
FSV-155	-65,6	0	1,56	0	-1866	0	0,09	-0,01	-0,01	-3,36	57633	0	0	0,01	-24,2	0,86

Con la Ecuación 3 y las constantes que aparecen en la tabla 5 fue posible representar el comportamiento de las variables a través de sus respectivas superficies de respuesta y optimizar las condiciones que permiten maximizar la concentración de polifenoles obtenibles del material vegetal, en la Figura 9 se puede apreciar los diferentes comportamientos de las variables involucradas a través de las superficies de repuesta para el clon TSH-565.

En las Figura 9 (a, b, c) se puede observar el comportamiento de EA y T, pH y T, SS y EA, mientras que en las Figura 10 (d, e y f) se aprecia el comportamiento de EA y pH, SS y pH, SS y T. En el eje z se encuentra el contenido de polifenoles totales en todas las gráficas.

Los clones CCN-51, FLE-3 TSH-565 e ICS-95 tienen un comportamiento similar, en el Anexo 3 se puede apreciar las gráficas de superficie de respuesta para estos clones.

Figura 9. Superficie de repuesta de polifenoles totales clon TSH-565



Las condiciones óptimas obtenidas por el diseño de experimentos se representan en la tabla 7.

Tabla7. Condiciones óptimas de extracción de polifenoles totales sobre la Cáscara de cacao

CLON	T [°C]	E/A [V:V]	pH	S/S [P:V]	PT [mgEAG/gms]
CCN-51	60	50:50	4	1/60	59,50
THS-565	60	50:50	5	1/60	98,30
FSV-155	60	75:25	6	1/60	59,84
FLE-3	60	50:50	6	1/30	65,84
ICS-95	60	50:50	5,5	1/120	93,81

2.5 EFECTOS DE LAS VARIABLES DE OPTIMIZACIÓN MÁS INFLUYENTES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (PT)

El análisis de la superficie de respuesta muestra la influencia de los factores en forma individual, sobre la concentración de polifenoles totales (PT) en cada uno de los 5 clones tratados.

2.5.1 Efecto de la temperatura. En la Tabla 7 se aprecia que para todos los clones, la temperatura óptima es de 60°C. Asimismo, en la Figuras 10 se observa que la concentración de polifenoles totales (PT) aumenta con el incremento de la temperatura. Este comportamiento está asociado con la capacidad que el calentamiento tiene de ablandar los tejidos vegetales, debilitando la integridad de la pared celular y a su vez, favoreciendo la liberación de los compuestos polifenólicos⁴⁰.

2.5.2 Efecto relación etanol-agua (E/A). En la Tabla 7 se aprecia que para los clones CCN-51, TSH-155, ICS-95 Y FLE3, la concentración de PT totales se maximiza a una E/A (50:50) (v:v). A partir de este resultado, se infiere que una mezcla de este tipo de solventes maximiza la extracción de polifenoles que tienen diferentes intervalos de polaridad. Este resultado no es sólo propio de la cáscara de cacao y ha sido observado para otros tipos de materiales. Así por ejemplo, los trabajos propuestos como los de Chew *et al.*, (2011) indican que se obtienen mejores resultados de extracción cuando se adiciona cierta cantidad de etanol al agua (50-60%, v:v). Por otro lado, el clon FLE-3 reportó una relación E/A (75:25), indicando que los compuestos polifenólicos son más solubles a mayor cantidad de etanol. Este comportamiento también fue reportado por Zhao *et al.*, (2008), donde indica que los compuestos bioactivos son más solubles a concentraciones altas de etanol que a bajas concentraciones de agua. Asimismo, este resultado sugiere

⁴⁰ Spigno, G., Tramelli, L., Faveri, D. M. D. Effects of extraction time, temperatura and solvent on concentration and antioxidantactivity of grape marc phenolics. En: journal of Food Engenniering. Vol. 81 (2007): p. 200-208.

que los extractos obtenidos para el clon FLE-3 tienen un perfil individual de polifenoles diferente al obtenido para los otros materiales evaluados. Bien entendido, esta hipótesis deberá ser validada mediante una caracterización individual que no hace parte del alcance de este trabajo. Sin embargo, el grupo de investigación CICTA se encuentra adelantando estos análisis.

2.5.3 Efecto del Ph. La Tabla 7 muestra que el pH óptimo para obtener la mayor concentración de PT varía según el clon a estudiar, este comportamiento ha sido reportado en la literatura por diferentes autores en otros tipos de material vegetal. Por ejemplo Sheabar y Neeman (1988) encontraron un máximo de solubilidad de polifenoles de orujo de oliva en una fase orgánica a pH 4. Baublis *et al.*, (2000) muestran como con un tratamiento ácido sobre salvado de trigo se mejora la capacidad antioxidante de las fracciones acuosas. Lehtinen y Laakso (1988), en la extracción acuosa de los antioxidantes de la fibra de avena, obtuvieron los máximos rendimientos en la extracción a pH 6.

2.5.4 Efecto de la relación soluto: solvente (S:S). En la Figura 9 (c) se muestra que el aumento de la cantidad de harina (soluto) en el extracto no presenta un comportamiento de carácter lineal, dicho comportamiento está sustentado por la saturación del solvente o la presencia de un medio muy diluido. Lo anterior está también sustentado por los principios de transferencia de materia, donde el diferencial de la concentración es la fuerza guía entre el sólido y el solvente. Cabe resaltar que estos resultados también fueron encontrados por ⁴¹ y ⁴²

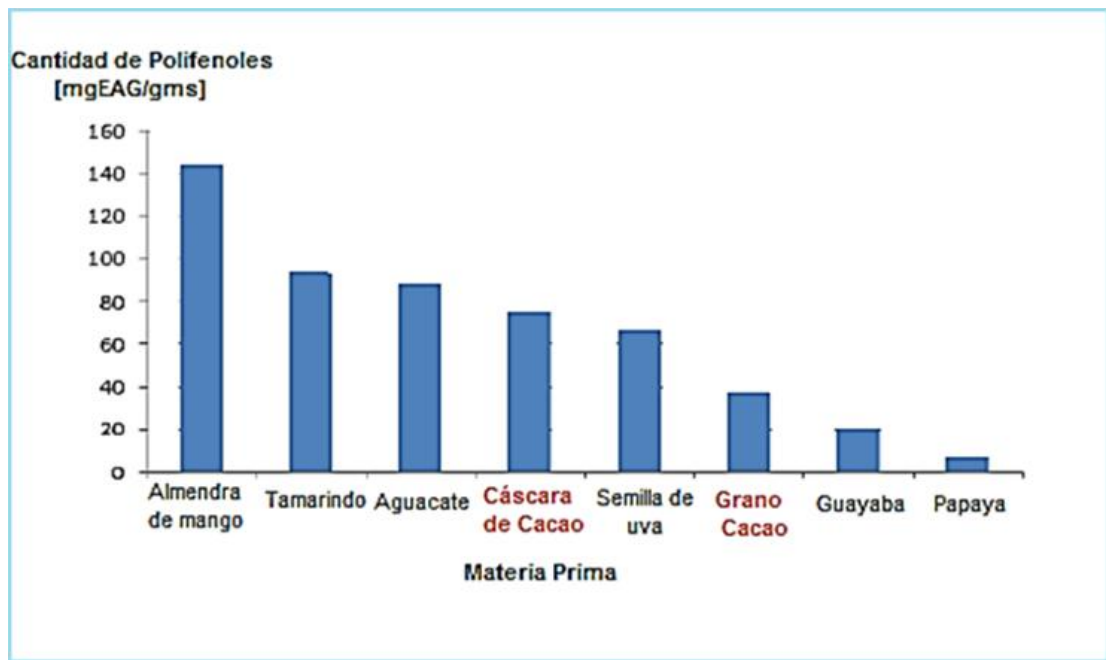
⁴¹ Tan, P. W.;Tan, C.P. Yho,C.W. Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centellaasiatica*). International Food Research Journal.18, 557-562, 2011.

⁴² Toro, S., Rosso, A., 2011. Optimización de las condiciones de extracción solido-líquido de polifenoles a partir de la almendra de mango hilacha.

2.6 COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES OBTENIDOS DE DIFERENTES MATRICES VEGETALES

En grafico 2 se muestran los datos de PT de algunas matrices vegetales.

Grafico 2. Comparación del contenido de polifenoles totales obtenidos de la cáscara de cacao versus otra matrices vegetales



De los resultados mostrados en grafico 2 se puede notar que los extractos obtenidos del aguacate, tamarindo, almendra de mango son 1,17; 1,25; 1,92 veces mayores que los obtenidos de la cáscara de cacao, respectivamente. Por otro lado, los extractos obtenidos de la cáscara de cacao son 1,13; 3,77; 10,78 veces mayores que los obtenidos de la semilla de uva, la guayaba y la papaya, respectivamente.

Según esto, los extractos obtenidos de la cáscara de cacao se perfilan como una opción de valorización de este tipo de residuo agroindustrial.

2.7 EVALUACIÓN Y COMPARACIÓN DE LA CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES EXTRAIDOS A CONDICIONES ÓPTIMAS DE LA HARINA DE CACAO DESENGRASADO (D) Y SIN DESENGRASAR (SD)

Una vez concluido el diseño experimental se procedió a evaluar el efecto del desengrasado de las muestras (harina), sobre la cantidad de polifenoles totales obtenidos al finalizar la extracción, para esto se trabajó con las condiciones óptimas obtenidas a partir del análisis del diseño experimental para el clon CCN-51 (Temperatura: 60°C, relación harina-Solución: 1/60 p/v, relación: EtanolAgua: 50/50 v/v y pH: 4).

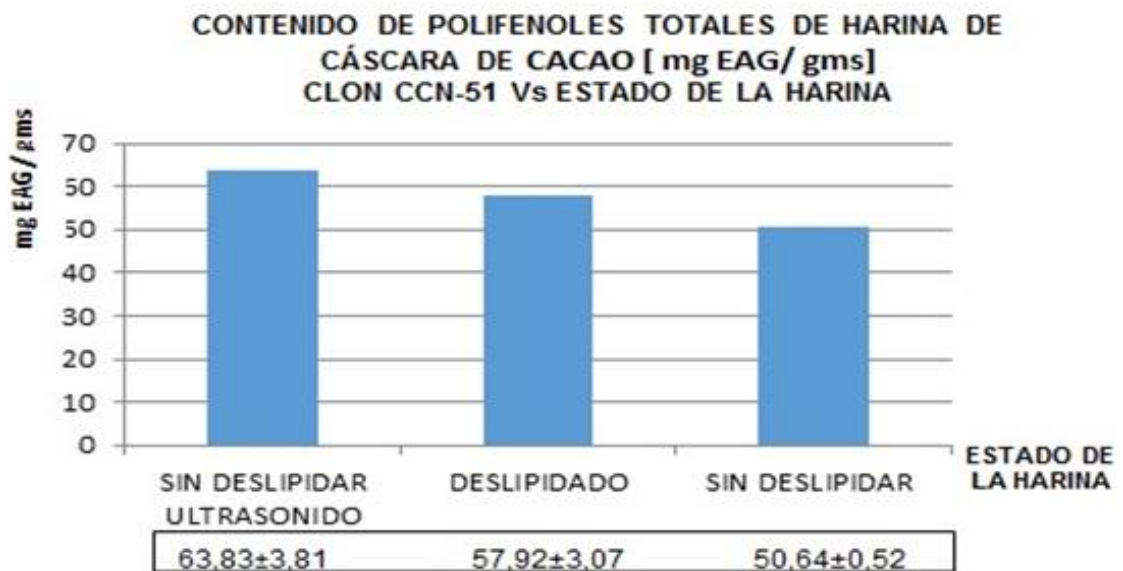
Los resultados plasmados en la grafico 3 muestran que la deslipidación de la muestra permite obtener una concentración de polifenoles 1,14 veces mayor que la muestra sin deslipidar. Este resultado es sorprendente si se considera que las diferencias en grasa total de ambas muestras no fue significativo (Tabla 4). Para explicar este comportamiento, se consideraron los estudios de ⁴³ los cuales sugieren que la implementación de ondas de ultrasonido por un tiempo de 15min aumentan la extracción de polifenoles en el grano de cacao, Así las cosas se decidió realizar un nuevo extracto con harina de cacao sin deslipidar valorando los efectos producidos por la etapa de sonicación. El experimento procedió de la siguiente forma: se pone en contacto la harina sin deslipidar con una solución etanol agua a una concentración 50-50 v/v por un tiempo de media hora, a temperatura ambiente. Seguidamente se procede con el proceso de extracción como se definió en la sección 1.8.

Los resultados obtenidos (grafico 3) muestran que la etapa de sonicación aumenta en un 26% el contenido total de polifenoles extraídos entre el extracto sin deslipidar (SD) y el extracto sin deslipidar pero con la etapa de ultrasonido

⁴³ Hammerstone, J et al., Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate, using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 47.No, 2, p.490-496. (1999).

(SDU). Al comparar éste último extracto (SDU) con el extracto a las mismas condiciones pero deslipidado (D) las diferencias no son significativas pero revelan que el extracto SDU contiene más polifenoles que el extracto SD.

Grafico 3. Polifenoles totales obtenidos sobre la harina de la cáscara del cacao deslipidada, sin deslipidar, y sin deslipidar con ultrasonido del clon CCN-51



2.8 AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS

En la tabla 8 se tabulan los parámetros cinéticos ajustados para cada modelo, así como el grado de ajuste. Según el coeficiente de correlación (R^2) el grado de ajuste de los modelos en orden descendente es Peleg modificado > Peleg > Logarítmico > Rakotondramasy.

Tabla 8. Ajuste de parámetros cinéticos sobre los modelos preestablecidos

CLON	MODELOS										
	RAKOTONDRAMASY		PELEG			PELEG MODIFICADO			LOGARÍTMICO		
	K4	R	K1	n	R	K2	K3	R	a	b	R
CCN-51	1,18900	0,88970	1,62300	0,00950	0,99120	0,00600	0,02220	0,99500	3,47990	40,10500	0,96800
TSH-565	1,85750	0,95870	1,81210	0,00500	0,99100	0,00200	0,01500	0,99600	3,08200	65,00900	0,95150
FLE-3	1,26400	0,85250	1,98310	0,00263	0,97120	0,003020	0,012956	0,9878	1,60092	70,31420	0,94120
FSV-155	2,13600	0,92302	1,48500	0,00400	0,99260	0,003816	0,012938	0,98830	1,50450	50,39920	0,96500
ICS-95	1,65280	0,90370	2,25600	0,00120	0,97280	0,02302	0,01341	0,98540	1,48560	60,57120	0,96400

Los resultados reportados fueron obtenidos en base al protocolo de extracción modificado

De estos resultados tabulados se concluye que el mejor modelo para describir el proceso de extracción de polifenoles totales a partir de la cáscara de cacao para los cinco evaluados es el de Peleg Modificado.

A pesar que el mejor ajuste se obtuvo empleando un modelo empírico (Peleg modificado), sus parámetros suministran información relevante desde el punto de vista del significado físico. En efecto, si se mira el valor de la constante K_2 ($\text{min} \times g_{HAMS} / \text{mgEAG}$), cuyo inverso es análogo a las constante de velocidad, se infiere que la extracción de compuestos polifenólicos a partir de la cáscara de cacao es un proceso rápido si se compara con la soya ya que el valor de la constante K_2 para la cáscara de cacao es 1,6 veces mayor al obtenido por⁴⁴ tomando como referencia el clon FLE-3 cuya constante es la de menor valor entre los clones evaluados. Asimismo si se compara el tiempo de extracción de polifenoles totales de otras matrices vegetales tales como la almendra de mango, la semilla de uva y la soya, cuyos tiempos de extracción son 94; 200 y 120 minutos respectivamente

⁴⁴ Jokic, S.; Velic, D.; Bilic, M.; Bucic-Kojic, A.; Inic, M. y Tomas, S. Modelling of the process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. En; Czech Journal Food Science. Vol.28, (2010); p 206-212

⁴⁵ ⁴⁶ ⁴⁷ con el tiempo de extracción de polifenoles extraídos de la cáscara de cacao (60 minutos) podemos afirmar que éste último es un proceso rápido.

Respecto a la constante K_3 , esta es considerada como el inverso de la concentración máxima obtenible para el proceso de extracción. El menor valor de concentración de polifenoles totales reportado en este estudio es el del clon CCN51, dicho clon presenta un valor de 59,50 mgEAG/gms que supera en 14,47 veces el valor obtenido para la soya⁴⁸. Así mismo la mayor concentración reportada en este trabajo es la del clon TSH-565 con un valor de 98,30 mgEAG/gms que supera en 1,51 veces el valor obtenido para la semilla de uva⁴⁹.

⁴⁵ Toro, S., Rosso, A., 2011. Optimización de las condiciones de extracción sólido-líquido de polifenoles a partir de la almendra de mango hilacha.

⁴⁶ Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, Y Velic, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenol from grape seeds. En. Journal of food Engineering. Vol.81, (2007); p.236-242.

⁴⁷ Jokic, S.; Velic, D.; Bilic, M.; Bucic-Kojic, A.; Inic, M. y Tomas, S. Modelling of the process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans. En; Czech Journal Food Science. Vol.28, (2010); p 206-212

⁴⁸ Ibid.

⁴⁹ Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, Y Velic, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenol from grape seeds. En. Journal of food Engineering. Vol.81, (2007); p.236-242.

3. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos de las pruebas bromatológicas y sonicación, se infiere que no es necesario incluir una etapa de deslipidación antes de iniciar el proceso de extracción. Sin embargo, se recomienda la sonicación porque con ella se aumenta el contenido de polifenoles totales extraídos hasta en un 26 %.

Después de realizar el análisis estadístico se confirmó que todas las variables evaluadas tienen una influencia significativa sobre la cantidad de polifenoles extraídos. Con los resultados de este análisis fue posible, ajustar el comportamiento de extracción a un modelo polinómico que fue empleado para optimizar las condiciones del proceso de extracción. En condiciones óptimas es posible obtener un extracto con una concentración de polifenoles que varía entre 59,50 y 98,30mgEAG/gms dependiendo del clon evaluado.

En lo que se refiere al ajuste de parámetros cinéticos, el modelo de Peleg Modificado es capaz de explicar los datos con un coeficiente de correlación $> 0,99$. Este tipo de ajuste enriquece las bases de datos de parámetros cinéticos de la extracción de polifenoles a partir de materias primas de carácter vegetal. Se espera que estos valores sean empleados en futuros estudios de simulación que permitan proponer diseños de plantas de extracción de este tipo de compuestos a partir de residuos agroindustriales.

BIBLIOGRAFÍA

Adziam, S.K and Asiam, E.K. Desing of a cocoa pod splitting machine. Research journal of Applied Sciences, Engineering and Technology 2, 7: 622-634, 2010.

Amendola, D.; de Faveri, D.M.; Spigno, G. Graphe marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. En Journal of Food Engineering. Vol. 97, 2010;p. 384-392

Argout, X.,Fouet, O., Wincker, P., Gramacho, K., Legavre, T., Sabau, X, Lanaud, C. (2008). Towards the underestanding of the cocoa transcriptome: Production and analysis of an exhaustive dataest of ESTs osTheobroma cacao L. generated from various tissues and under various conditions. BMC Genomics, 9,512 – 530.doi: 10.1186/1471-2164-9-512.

Arabshahi, S., Devi, V., Urooj, A. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts and their heat, pH and storage stability.2005.p; 1100-1105

Azadeh y Hermann, 2012. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls.

Azizah, A., Nick, M., Swee, Tee. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products.1998. p; 199-202.

Barazarte, H.; Sangronis, E. and Unai, E. La cascara de cacao (Theobroma cacao L.): Una posible fuente comercial de pectinas. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 58, 64–70,2008.

Beltrán, Raúl. Caracterización de los Efectos Biológicos de los Polifenoles en la Inflamación y el Metabolismo, España, 2011, Trabajo de Doctorado. Universidad Rovira y Virgili. Facultad de Medicina.

Braudeau, J. 1970. El cacao. Técnicas agrícolas y producciones tropicales. Barcelona, España. Editorial Blumé. 297 p.

Brunetto M., Gutiérrez L., Delgado Y., Galignani M., Zambrano A.,

Gomez A., Ramos G., Romeroet C. Determination of theobromine, theophylline and caffeine in cocoa samples by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system. *Food Chemistry*. 2007, 100, 459 – 467.

Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic. Y Velic, D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenol from grape seeds. En. *Journal of food Engineering*. Vol.81, (2007); p.236-242.

Cadena, T.; Herrera, J. Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia, 2008.

Chen, Y., Kao, W., Kuo., W. Effects of pH on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars. 2007; p 250-257

Chew, K. K.; Khoo, M. Z.; Nopg, S. Y.; Thoo, Y. Y.; Wan Aida, W.M.Y.; HO, C. W. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of

Orthosiphonstamineus extracts. *International Food Research Journal*.18, 1427 – 1435, 2011.

Chirinos, R.; Ruez, H.; Campos.;Pedreschi,R.YLarondelle,y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compound from mashua (*Tropaeolumtuberosum*Ruíz&Pavón) tubers. En: *Separation and Purification Technology*.Vol.55, 2007;p.217-225.

Conde, Enma.Revalorización de Residuos Agroindustriales y Forestales para la Obtención de Antioxidantes Naturales con aplicaciones en la Industrial Alimentaria, cosmética y/o Farmacéutica. Ourense, España, 2009, Trabajo de Maestría. Universidad de Vigo. Facultad de Química.

Cooper, K. A., Donovan, J. L., Waterhouse, A. L., & Williamson, G. Cocoa and health: A decade. of research. *British Journal of Nutrition*, 99, 1–11, 2009.

Corcuera L., Amézqueta S., Arbillaga L., Vетtrorazzi A., Touriño S., Torres J., López A.A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*.2012, 50, 989–995.

Espinal, C. F., Martínez H. & Ortiz, L. 2005.*La Cadena Del Cacao En Colombia: Una Mirada Global de su Estructura y Dinámica* 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia. Bogotá (Colombia), 51p.

Federación Nacional de Cacao, Disponible en
<<http://www.fedecacao.com.co/site/index.php/1eco-economia>>.

Giao, M., Pereira, C., Fonseca, S., Pintado, M., Malcata, F. Effect of particle size upon the exten of extraction of antioxidant power from the plants

agrimoniaeupatoria, Salvia sp. and Satureja Montana. En: Journal of food Chemistry. Vol. 117 (2009) p. 412-416.

Hammerstone, J et al., Identification of procyanidins in cocoa (Theobroma cacao) and chocolate, using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 47. No, 2, p.490-496. (1999).

HappiEmaga, T., Ronkart, S.N., Robert, C., Wathelet, B., Paquot, M. Characterisation of pectins extracted from banana peels (Musa AAA) under different conditions using an experimental design. Food Chemistry. 108, 463–471, 2008.

Jokic´, S.;Velic´,D.;Bilic´,M.;Bucic´-Kojic´,A.;Inic´M. y Tomas,S. Modelling of the process of Solid-Liquid Extraction of Total Polyphenols from Soybeans.En;Czech Journal Food Science.Vol.28,(2010);p 206-212

Kalapathy, U., Proctor, A. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. Food Chemistry.73, 393–396, 2001.

Koubala, B.B., Kansci, G., Mbome, L.I., Crepeau, M.-J., Thibault, J.-F., Ralet, M.C. Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Ameliorée” and “Mango” mango peels. Food Hydrocolloids 22, 1345–1351, 2008.

Levigne, S., Ralet, M.-C., Thibault, J.-F. Characterisation of pectins extracted from fresh sugar beet under different conditions using an experimental design. Carbohydrate Polymers.49, 145–153, 2002.

Martin M., Goya L., Ramos S. Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and chemical toxicology*. 2013, 56, 336–351.

Martinez, R.; Torres, P.; Meneses, M.A.; Figueroa, J.G.; Perez, Alvarez, J.A.; Viuda, Martos, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49, 39–45, 2012.

Mejía, L.A. & Argüello O. 2000. *Tecnología para el mejoramiento del sistema de producción de cacao*. Publicaciones CORPOICA. Regional 7. Bucaramanga (Colombia), 140p.

Misnawi J., Bakar J., Saari N. Oxidation of polyphenols in unfermented and partly fermented cocoa beans by cocoa polyphenol oxidase and tyrosinase. *J. ScifoodAgric*. 2002, 82, 559-556.

Nutrinat. Disponible en <http://www.nutrinat.com/actualidad-salud/suplementosnaturales/antioxidantes/antioxidantes-el-auge-de-los-polifenoles#.U8QJO_I5OAU>

Pagan, J., Ibarz, A. Extraction and rheological properties of pectin from fresh peach pomace. *JournalFoodEngineering*. 39, 193–201, 1999.

Parra, D. 1994. *Diagnóstico de enfermedades que afectan el cultivo del cacao en Barlovento y su comportamiento epidemiológico*. In: Taller Nacional de Cacao. Estación Experimental Miranda. Caucagua (Venezuela). Resúmenes, 21p.

Perea-Villamil, Aide., Martinez-Guerrero, Nubia., Aranzazu-Hernández, Fabio., Cadena- Cala, Tatiana., (2013). Características de calidad del cacao de Colombia

Perea, J., Cadena T., Herrera J. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud UIS*.2009, 41,128-134.
PinzónUseche José Omar.2012. *Manejo fitosanitario del cultivo de cacao**Theobromacacao*L – medidas para la temporada invernal. ICA - Federación Nacional de Cacaoteros. Bogotá (Colombia), 43 p.

Portafolio, 2014. Disponible en
<<http://www.portafolio.co/archivo/documento/CMS7305529>>

Quiñones M., Miguel A., Muguera B., ALeixandrea D. Effect of a cocoa polyphenol extract in spontaneously hypertensive rats.*Food Funct*.2011, 2, 649.

Scalbert, A. and G. Williamson, 2000.Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, 130 (8s suppl.):2073s-2085s.

Sector AgroindustrialColombiano, 2012.Disponible en
<<http://www.inviertaencolombia.com.co/Adjuntos/Perfil%20Sector%20Agroindustrial%20Colombiano%20-%202012.pdf>> VERMERRIS, W y NICHOLSON., R.
Phenolic compound biochemistry; Springer,New York, EE.UU., 2008, 1-24>.

Spigno, G., Tramelli, L., Faveri, D. M. D. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. En: *Journal of Food Engineering*. Vol. 81 (2007): p. 200-208.

Tan, P. W.;Tan, C.P. Yho,C.W. Antioxidant properties: Effects of solid-to-solvent ratio on antioxidant compounds and capacities of Pegaga (*Centellaasiatica*). *International Food Research Journal*.18, 557-562, 2011.

Tomas-Barberñ F., Cinefuegos E., Marn A., Muguera B., Gil A.,Cerd B., Zafrilla P., Morillas J., Mulero J., Ibarra A., Pasamar M.,Ramn D., ESPN J. A new process

to develop a cocoa powder with higher flavonoids monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 3926-3935.

Toro, S., Rosso, A., 2011. Optimización de las condiciones de extracción sólido-líquido de polifenoles a partir de la almendra de mango hilacha.

Van der Sluis, A.A., Dekker, M., de Jager, A., Jongen, W.M.F., 2001. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: Effect of cultivar, harvest year and storage conditions. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3606-3613.

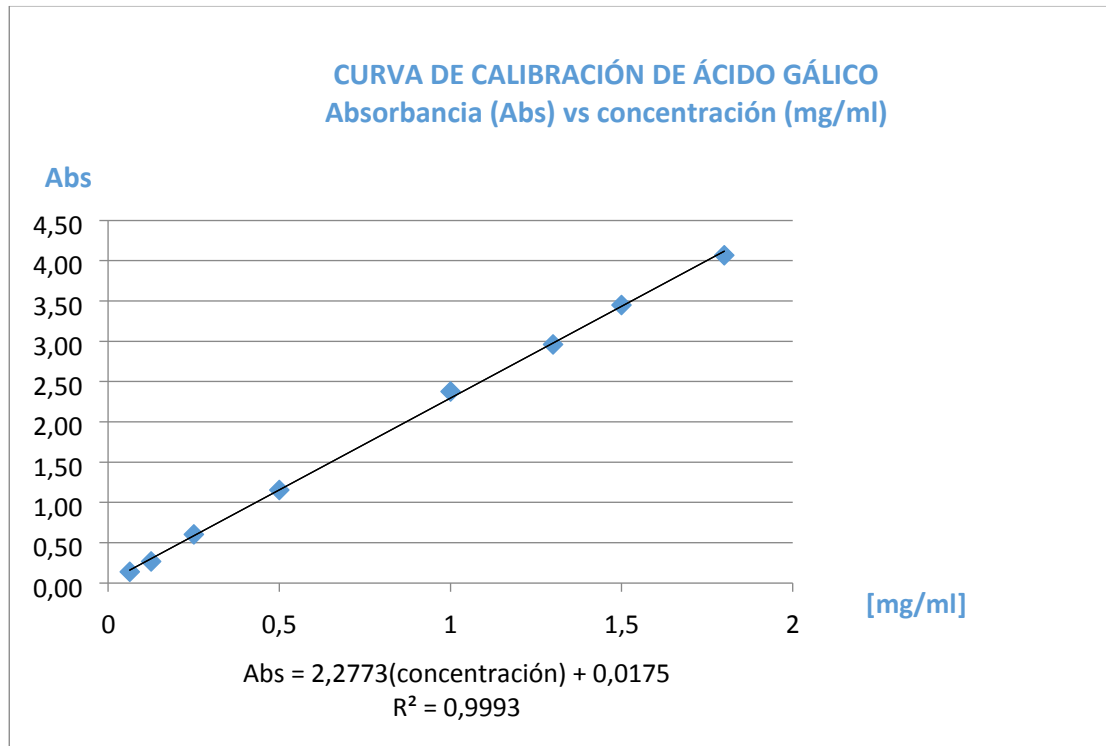
Vinson, J.A. and B.A. Hontz, Phenol antioxidant index: comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. *J Agric Food Chem.* 43:401-403. 1995.

Zhao, B., Hall, C. composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. En: *Journal of Food Chemistry.* Vol. 108 (2008).p. 511-518.

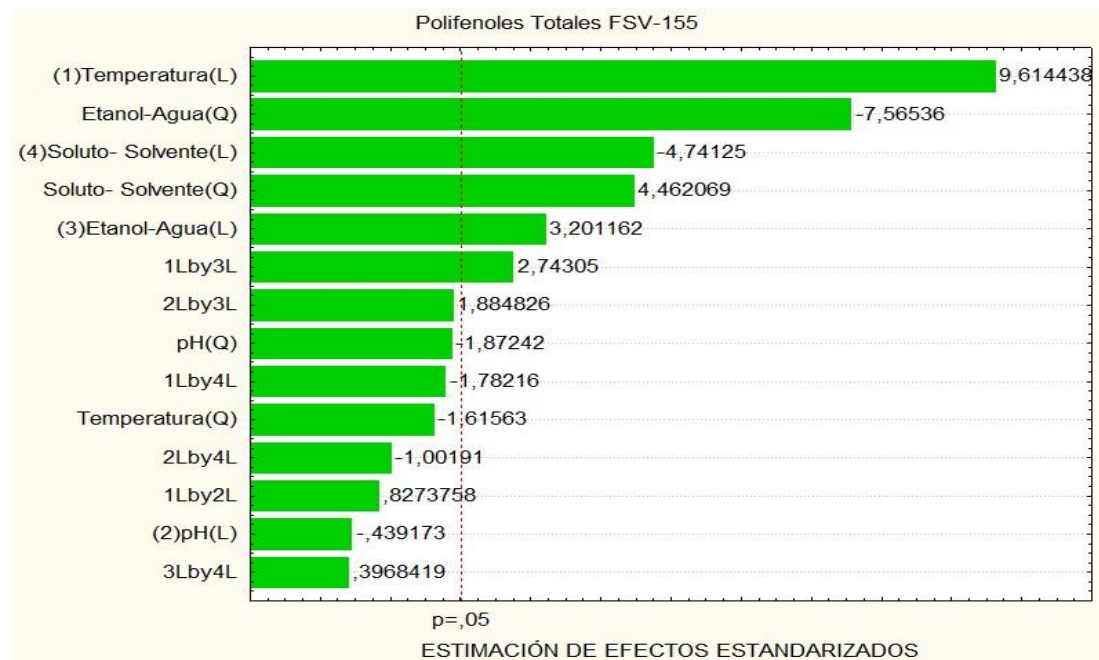
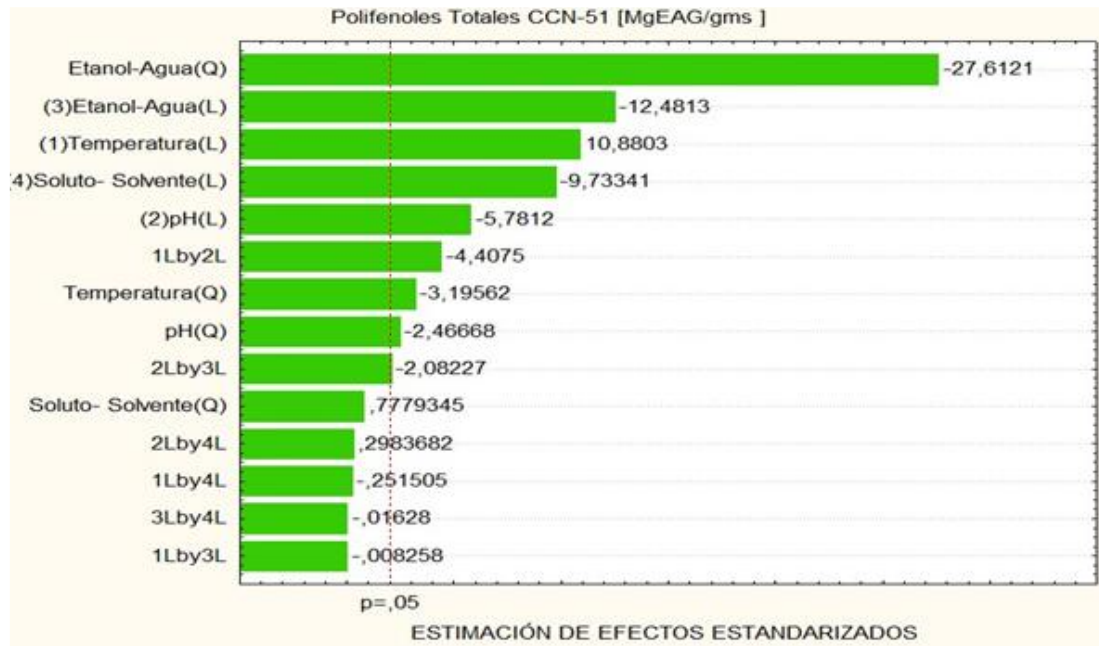
Zomer E., Owen A., Magliano D., Liew D., Reid C. The effectiveness and cost effectiveness of dark chocolate consumption as prevention therapy in people at high risk of cardiovascular disease: best case scenario analysis using a Markov model. *BMJ.* 2012, 344, 1-9.

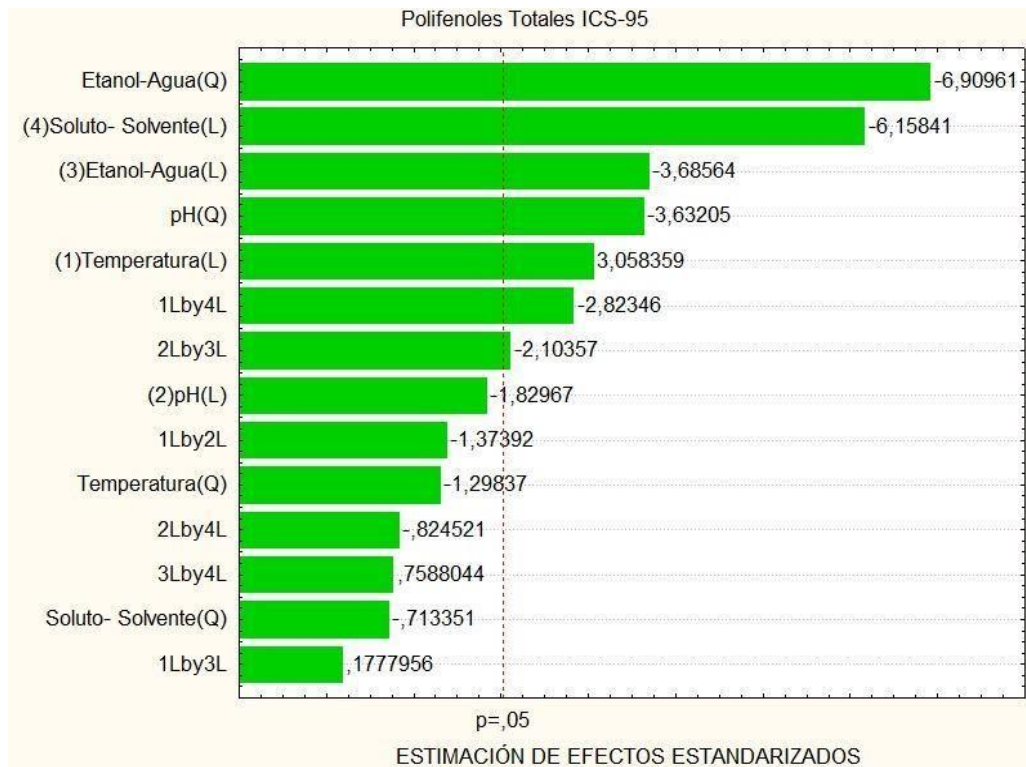
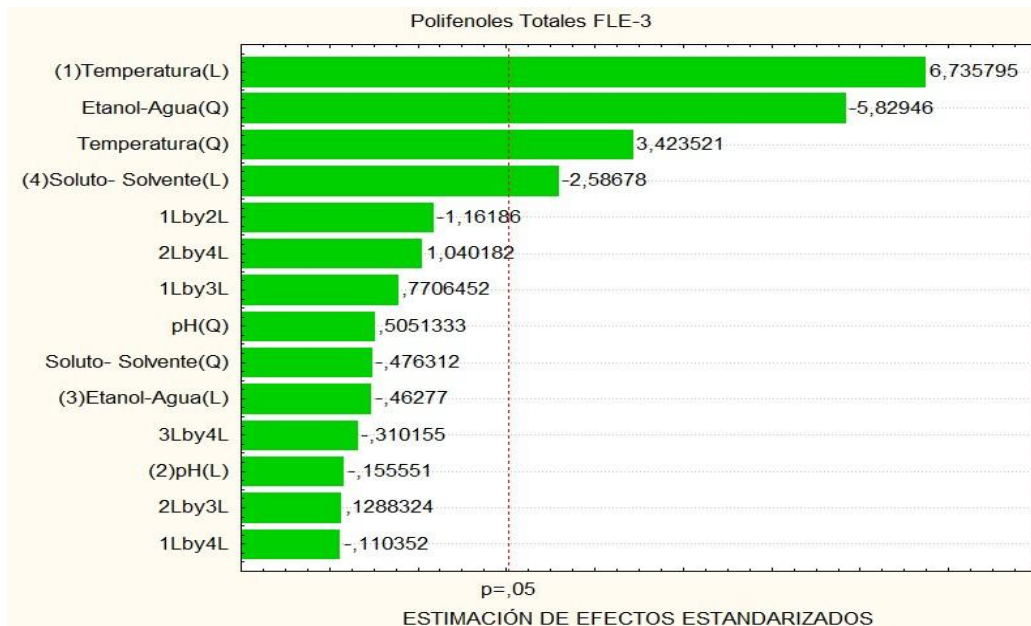
ANEXOS

ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ÁCIDO GÁLICO



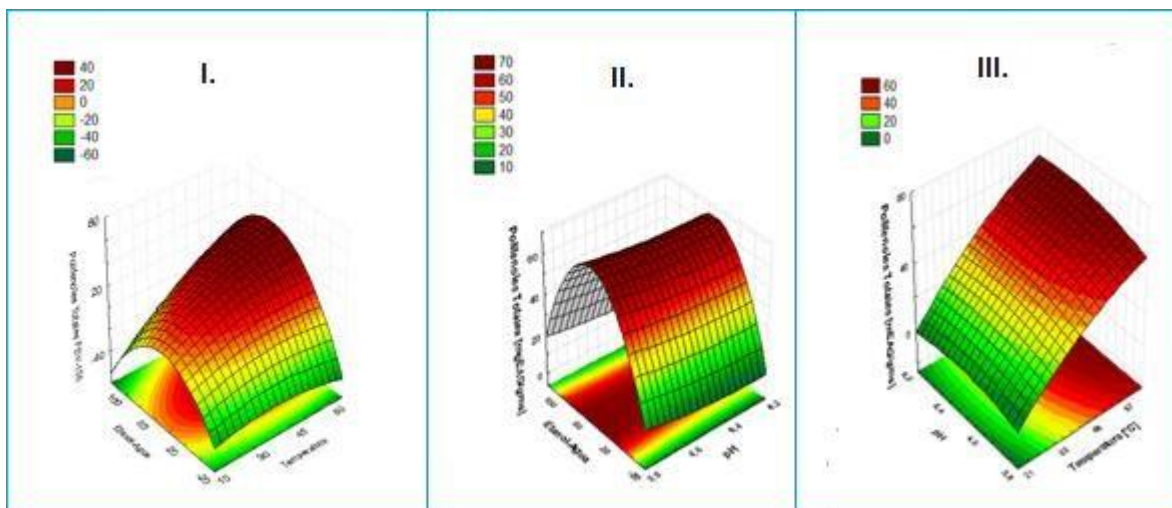
ANEXO B. DIAGRAMA DE PARETOS PARA EFECTOS ESTANDARIZADOS





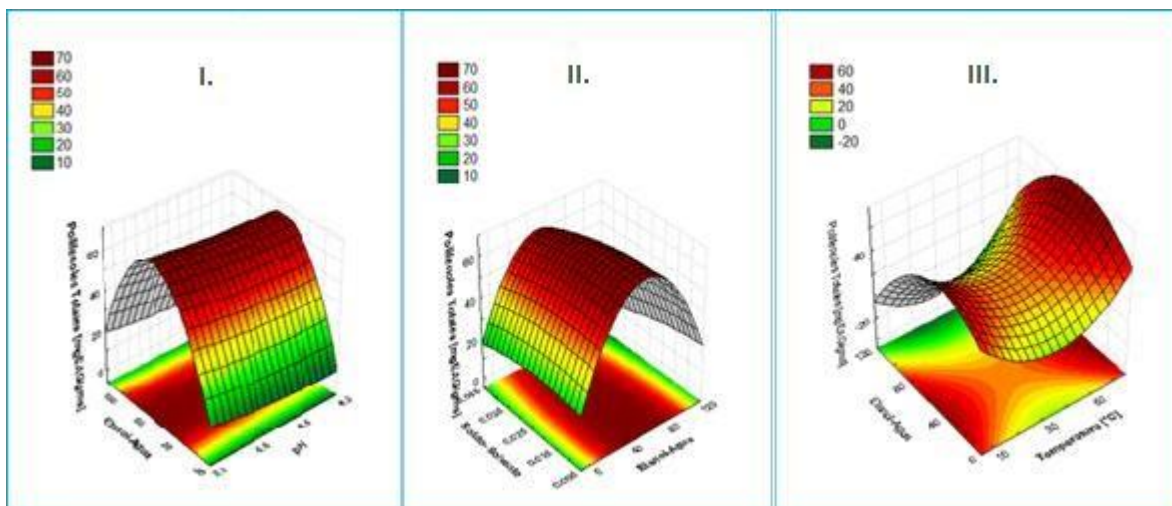
ANEXO C. GRÁFICAS DE SUPERFICIES DE RESPUESTA PARA LOS CLONES: CCN-51, FLE-3 E ICS-95

Superficie de respuesta de polifenoles totales clon CCN-51

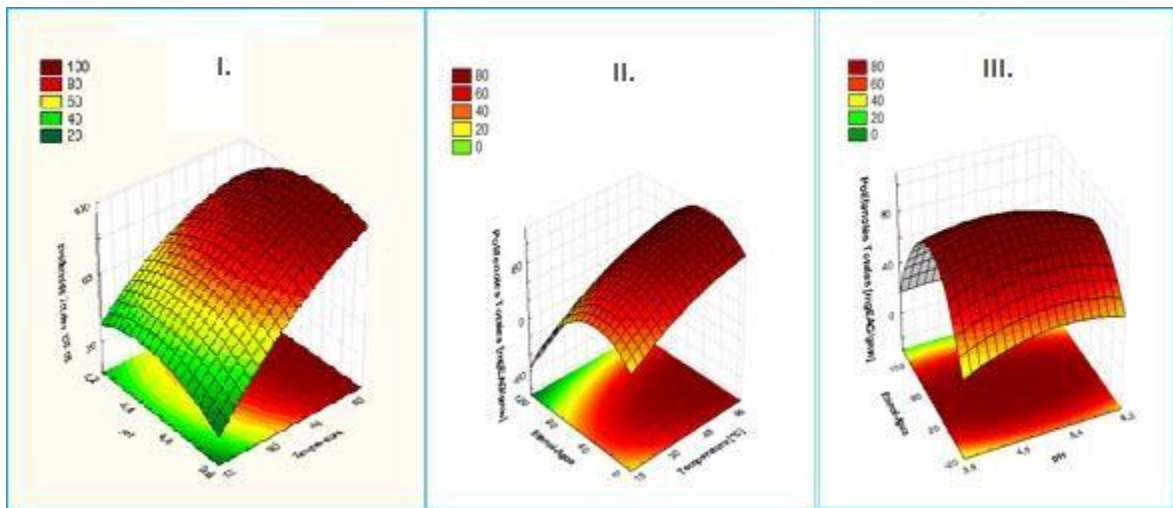


I. Etanol – Agua vs Temperatura; II. Etanol – Agua vs pH; III. Ph vs Temperatura

Superficie de respuesta de polifenoles totales clon FLE-3.



I. Etanol – Agua vs pH; II. Solutivo – solvente vs Etanol – Agua; III. Etanol – Agua vs Temperatura



I. pH vs Temperatura; II. Etanol – agua vs Temperatura; III. Etanol – Agua vs pH