



Universidad
Industrial de
Santander

EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA REMOCIÓN DE METILXANTINAS DE EXTRACTOS DE CACAO

JONATHAN MAURICIO AYALA LEÓN

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2016

**EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA
LA REMOCIÓN DE METILXANTINAS DE EXTRACTOS DE CACAO**

JONATHAN MAURICIO AYALA LEÓN

Proyecto de Grado para optar al título de Ingeniero Químico

Director

CARLOS JESÚS MUVDI NOVA
Ingeniero Químico, Mc.S., Ph.D.

Co-Director

LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO
Ingeniero Químico, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍAS FÍSICO QUÍMICAS
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA

2016

DEDICATORIA

A Dios, quien ha sido mi compañero fiel en la felicidad y tristeza y a quien amo más que a cualquier otro ser.

A mis padres Miguel Ángel Vega y Verénice León, quienes con su ejemplo han formado un hombre lleno de valores y con deseos de ser mejor día a día en todos los ámbitos de la vida.

A mi familia, por su incondicional apoyo en este proceso y cada meta que me he trazado, especialmente a mi hermana Luisa Fernanda.

Jonathan Mauricio Ayala León

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones que ha derramado sobre mí, por cada día de vida, salud y por su incondicional apoyo día a día.

Al profesor Carlos Jesús Muvdi Nova, quien más que un director fue como un padre en este proceso, dejándome enseñanzas valiosas para la vida.

Al profesor Luis Javier López por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto y conocer un poco de las maravillas del cacao. Además por su colaboración en la codirección de este trabajo.

Al CICTA y todo su grupo de trabajo Arley, Luis Carlos, Lady, Alejandra, Cristian y Sergio, quienes siempre tuvieron actitud positiva para enseñarme y guiarme en el laboratorio.

A Said Toro, quien a pesar de la distancia siempre estuvo pendiente del proyecto y su avance.

A Carolina Sarmiento quien fue mi apoyo en este proceso mi compañera y ayudante en redacción.

A mi familia en general por su incondicional apoyo.

A la universidad Industrial de Santander por el conocimiento y las experiencias que me entrego.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. METODOLOGÍA	20
1.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE DE ALIMENTACIÓN Y DE EXTRACCIÓN SOBRE LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS	21
1.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL PH, SOBRE LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO	22
1.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL NÚMERO DE CICLOS Y LA RELACIÓN DE LAS FASES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO	23
1.4 MATERIALES Y MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN	23
1.4.1 Métodos de cuantificación	24
2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
2.1 EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LAS FASES DE ALIMENTACIÓN Y SOLVENTE SOBRE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE TEOBROMINA Y DE CAFEÍNA	27
2.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA Y TEOBROMINA Y LA CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES EN EL EXTRACTO DE CACAO	30
2.3 EFECTO DEL PH SOBRE LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS Y CONSERVACIÓN DE POLIFENOLES EN EL EXTRACTO DE CACAO Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	33

2.4 INFLUENCIA DEL NÚMERO DE CICLOS Y RELACIÓN DE LAS FASES EN LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS Y EL EFECTO SOBRE LOS POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE CACAO.	38
3. CONCLUSIONES	45
4. RECOMENDACIONES	46
BIBLIOGRAFÍA	47
ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Cuadro metodológico	20
Figura 2. Coeficientes de partición de metilxantinas, fase de alimentación solución teobromina y cafeína en etanol:agua 50:50 y 100% agua, usando cloroformo (CFM) y diclorometano (DCM) como solventes de extracción T=25°C; pH= 7; sin agitación. *desviaciones medias	27
Figura 3. Porcentajes de extracción de metilxantinas, variando la fase de alimentación y de extracción. Relación volumétrica igual a uno (1), T=25°C, pH= [6,3-7,2], sin agitación. *Desviaciones medias	29
Figura 4. Efecto del tiempo sobre la cantidad polifenoles totales del extracto de cacao, evaluado a temperatura de 35°C, pH=7. *Desviación media	30
Figura 5. Coeficientes de partición (P) para cafeína, con cloroformo (CFM) y diclorometano (DCM) como agente extractor y soluciones preparadas de cafeína y teobromina en etanol:agua 50:50 como fase de alimentación, pH=7, sin agitación. *Desviaciones medias	31
Figura 6. Coeficientes de partición (P) para teobromina con CFM y DCM como agente extractor y soluciones preparadas de cafeína y teobromina en etanol: agua 50:50 como fase de alimentación, pH=7, sin agitación. *Desviaciones medias	32
Figura 7. Coeficientes de partición de metilxantinas. Usando CFM como fase de extracción y extracto de cacao como fase de alimentación, T=25°C, sin agitación.*Desviación media	33
Figura 8. Polifenoles totales después de la extracción de metilxantinas en función del pH. Usando cloroformo como fase de extracción y extracto de cacao como fase de alimentación, sin agitación. *Desviación media	35

Figura 9. Capacidad antioxidante por el método ABTS, después de la extracción de metilxantinas en función del pH. Usando cloroformo como fase de extracción y extracto de cacao como fase de alimentación, sin agitación.	
*Desviación media	37
Figura 10. Capacidad anti-radical por el método de DPPH, después de la extracción de metilxantinas en función del pH. Usando cloroformo como fase de extracción y extracto de cacao como fase de alimentación, sin agitación.	
*Desviación media	37
Figura 11. Efecto del número de ciclos y relación de fases [Alimentación/Extracción] sobre la concentración de cafeína en el extracto de cacao, usando DCM como agente de extracción. T=25°C, pH=7, sin agitación.	
*Desviaciones medias	38
Figura 12. Efecto del número de ciclos y relación de fases [Alimentación/Extracción] sobre la concentración de cafeína en el extracto de cacao, usando CFM como agente de extracción. T=25°C, pH=7, sin agitación. *Desviaciones medias	
	39
Figura 13. Efecto del número de ciclos y relación de fases [Alimentación/Extracción] sobre la concentración de teobromina en el extracto de cacao, usando DCM como agente de extracción. T=25°C, pH=7, sin agitación.	
*Desviaciones medias	40
Figura 14. Efecto del número de ciclos y relación de fases [Alimentación/Extracción] sobre la concentración de teobromina en el extracto de cacao, usando CFM como agente de extracción. T=25°C, pH=7, sin agitación.	
*Desviaciones medias	40
Figura 15. Efecto del número de ciclos y relación de volúmenes sobre los polifenoles totales usando DCM como agente de extracción	44
Figura 16. Efecto del número de ciclos y relación de volúmenes sobre los polifenoles totales usando CFM como agente de extracción	44

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Niveles y factores utilizados para el diseño de experimentos de la Etapa 2	22
Tabla 2. Porcentaje de extracción teobromina/ ml de solvente para cada relación de fases y número de ciclos, usando DCM y CFM como agentes de extracción y extracto cacao como fase de alimentación	41
Tabla 3. Porcentaje de extracción/ ml de solvente para cada relación de fases y número de ciclos, usando DCM y CFM como agentes de extracción y extracto cacao como fase de alimentación	42

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Procedimiento determinación de polifenoles totales	53
Anexo B. Procedimiento determinación de capacidad antioxidante por ABTS	54
Anexo C. Procedimiento determinación de capacidad antiradicalaria	56

RESUMEN

TITULO: EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO PARA LA REMOCIÓN DE METILXANTINAS DE EXTRACTOS DE CACAO*

AUTOR: JONATHAN MAURICIO AYALA LEÓN**

PALABRAS CLAVES: Extracción, Líquido-líquido, Metilxantinas, Polifenoles, Cacao.

DESCRIPCIÓN: Se evaluó la técnica de extracción líquido-líquido en la remoción de metilxantinas de extractos de cacao con composición mayoritaria de polifenoles y metilxantinas, con el objetivo de tener extractos ricos en polifenoles. Se evaluó el efecto de las fases de alimentación (etanol:agua 50%: 50% y agua 100%) y solvente (cloroformo y diclorometano); pH (4,7 y 10), temperatura (15 °C, 25 °C y 35 °C) , número de ciclos (hasta 3 ciclos) y relación alimentación: solvente (1:0,5 ; 1:1 ; 1:2 ; 1:3) sobre la remoción de metilxantinas del extracto, la conservación de los polifenoles totales, la capacidad antioxidante y anti-radicalaria.

Se encontró que la extracción de metilxantinas totales fue mejor con etanol:agua 50%: 50% que usando solo agua como fase de alimentación. Por otro lado, la temperatura mostró no ser relevante sobre la extracción de metilxantinas ni la cantidad de polifenoles del extracto. El pH entre más alcalino fue mejor fue la extracción de metilxantinas; sin embargo, la pérdida de polifenoles totales fue mayor también. Se encontró que a mayor número de ciclos y cantidad de solvente la extracción fue mayor. Finalmente, se encontraron las siguientes condiciones de operación como las mejores: solvente de extracción cloroformo, fase de alimentación etanol:agua 50:50, relación volumétrica entre las fases 1:2, pH 7, a 25°C y 3 ciclos, con las cuales se extrajo más del 99,5% de las metilxantinas totales y se perdieron menos de 3,95 % de los polifenoles totales.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías Físico-químicas, Escuela de Ingeniería Química, Director: Carlos Jesús Muvdi Nova, ingeniero Químico, M.Sc, Ph.D. Co-director: Luis Javier López Giraldo, ingeniero Químico, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: EVALUATION OF THE LIQUID-LIQUID EXTRACTION TECHNIQUE FOR THE REMOVAL OF METHYLYXANTHINES FROM COCOA EXTRACTS*

AUTHOR: JONATHAN MAURICIO AYALA LEÓN**

KEY WORDS: Extraction, Liquid-liquid, Metilxantines, Polyphenols, Cocoa.

SUMMARY: The liquid-liquid extraction technique was evaluated in the removal of methylxanthines from cocoa extracts with the majority composition of polyphenols and methylxanthines, in order to obtain extracts rich in polyphenols. The effect of the feeding phase (ethanol: water 50:50 %v/v and water 100 %v/v) and solvent phase (chloroform and dichloromethane), pH (4, 7 and 10), temperature (15 °C, 25°C and 35°C), cycles number (up to 3 cycles) and relation feed:solvent (1: 1: 1; 1: 2; 1: 3) were evaluated, on the removal of methylxanthines from the extract, the preservation of total polyphenols, anti-oxidant and anti-radical capacity.

It was found that the extraction of total methylxanthines was better with ethanol: water 50:50 %v/v than using only water as feed phase. On the other hand, the temperature was not relevant on the extraction of methylxanthines nor the amount of polyphenols in the extract. While pH was more alkaline the extraction of methylxanthines was better; however, the loss of total polyphenols was greater as well. It was found that at higher number of cycles and amount of solvent the extraction was higher. Finally, the following operating conditions were found to be the best: chloroform as solvent phase , ethanol: water 50:50 %v/v as feed phase, volumetric ratio feed: solvent 1: 2, pH 7, at 25 °C and 3 cycles, extracting more than 99.5% of the total methylxanthines and losing less than 3.95% of the total polyphenols.

* Degree Work

** Physical Chemistry Faculty of Engineering, School of Chemical Engineering. Advisor: Carlos Jesús Muvdi Nova, Chemical Engineer, M.Sc. And Ph.D. Co-Advisor: Luis Javier López Giraldo, Chemical Engineer and Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son compuestos bioactivos, producidos como metabolitos secundarios por las plantas, “a los cuales se les atribuyen efectos antioxidantes en el cuerpo humano”¹. Específicamente, “los polifenoles presentes en productos de cacao, han demostrado en ensayos in vitro e in vivo, que podrían ser un importante medio para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer”². Además, “tienen efectos anti-inflamatorio”³, “anti-artrítico”⁴, “antibacterial”⁵, “antioxidante”⁶, entre otros.

Adicionalmente, “se ha encontrado que el cacao no solo es rico en polifenoles, sino también en metilxantinas (teobromina, cafeína y teofilina) y otros compuestos funcionales, como azúcares, proteínas, grasas y fibra”⁷. “Las principales metilxantinas presentes en el cacao son la teobromina y la cafeína, siendo el cacao

¹ ARRANZ MARTÍNEZ, Sara (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2010. 96 p.

² GUTIÉRREZ MAYDATA, B. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. Cuba: Farmacéutica Bonaerense, 2002. p. 149-152

³ SUEOKA SUGANUMA, E, et al. A new function of green tea: prevention of lifestyle-related diseases. En: Ann N Y Acad Sci. April, 2001. vol. 28. p. 274-280

⁴ HAQQI, Tariq, et al. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. May, 1999. vol. 96. p. 4524-4529

⁵ SUDANO ROCCARO, A, et al. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. En: Antimicrob Agents Chemother June, 2004. vol. 48. p. 1968-1973

⁶ OSADA, K, et al. Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. En: Comparative Biochemistry and Physiology. February, 2001. vol. 128. p. 153-164

⁷ RODRIGUEZ CAMPO, J, et al. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. En: Food Chemistry. May, 2012. vol. 132. p. 277–288.

la principal fuente de teobromina con concentraciones cercanas a 11,8 mg/g muestra seca. En comparación con el café y el té, el cacao tiene un contenido bajo de cafeína cercano a 4,2 mg/g muestra seca y sólo trazas de teofilina”⁸. “Las metilxantinas han sido asociadas con efectos adversos para algunas personas, en sistemas del cuerpo, incluyendo el nervioso central, gastrointestinal, respiratorio y renal”⁹. Es por esto que existe un interés en separar las metilxantinas de los polifenoles, para potencializar los beneficios de estos últimos.

“La dificultad para realizar esta separación se encuentra en que los métodos desarrollados hasta la fecha para extraer polifenoles, no son selectivos únicamente para estas sustancias; en ese proceso también se extraen las metilxantinas presentes en la matriz”¹⁰.

Algunas de las técnicas utilizadas para la purificación de polifenoles son: destilación, “que es el método menos eficaz para este propósito, ya que la utilización de altas temperaturas altera la estructura funcional de los polifenoles”¹¹. Otro método de separación a nivel de laboratorio se hace usando cromatografía en columna, “que pese a tener resultados aceptables en cuanto a selectividad, comprende un proceso

⁸ NIEMENAK, N, et al. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. En: Journal of Food Composition and Analysis. May, 2006. vol. 18. p. 612–619

⁹ JUN JIE, Dong, et al. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination. En: Food and Bioproducts Processing. May, 2011. vol. 89. p. 62-66

¹⁰ SARMIENTO, L, et al. Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. En: Journal of Supercritical Fluids. May, 2008. vol. 45. p. 64-69

¹¹ BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to the Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Steinkopff: Darmstadt, 1994. 385 p.

lento y difícil de escalar a nivel industrial, es decir, poco productivo”¹². Por otro lado, la técnica más estudiada en la actualidad en el tema de separación de polifenoles, es el arrastre con fluidos supercríticos mezclados con solventes polares (SFE). “Con esta técnica se obtienen resultados prometedores en cuanto a porcentaje de recuperación y la no utilización de solventes tóxicos, pero implica costos elevados de inversión inicial, lo que la hace menos atractiva a la hora de escalar a nivel industrial”¹³. También se ha estudiado, la extracción líquido – líquido (LLS), “que es una técnica cuyos resultados se consideran muy buenos en cuanto a porcentajes de separación; sin embargo, esta técnica usa solventes como el hexano y cloroformo que para algunos usos resultan no ser permitidos y finalmente se encuentran trazas de solvente en el producto final. Varios estudios muestran que las trazas de solvente son cancerígenos, lo que limita su uso para fines médicos o alimenticios”¹⁴.

La extracción con solventes es un método que usa la diferencia en solubilidades de algunas sustancias químicas disueltas en dos fases. “La fuerza impulsora de la extracción con solventes es el gradiente de potencial químico de una especie dada entre una fase orgánica y una acuosa”¹⁵. Los reportes encontrados concernientes a eliminación de metilxantinas han sido referentes al proceso de descafeinado en extractos de hojas de té y grano de café, es decir, que no existe información sobre

¹² SHIOI, Yuzo, et al. Separation of Photosynthetic Pigments by High-performance Liquid Chromatography. Comparison of Column Performance, Mobile Phase, and Temperature. En: Procedia Chemistry. May, 2015. vol. 14. p. 202–210

¹³ MANKI, Maoela. Electroanalytical determination of catechin flavonoid in ethyl acetate extracts of medicinal plants. En: International Journal of Electrochemical Science. December, 2009. vol. 4. p. 1497-1510

¹⁴ SARMIENTO, L, et al. Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. En: Journal of Supercritical Fluids. May, 2008. vol. 45. p. 64-69

¹⁵ AGUILAR, Manuel y CORTINA, José. Solvent extraction and liquid membrane. Fundamental and applications in new materials. Boca Raton: CCR press, 2010. 344 p.

la extracción de teobromina, que como se mencionó anteriormente, “es el compuesto más abundante de la familia de metilxantinas en el cacao”¹⁶.

El cacao -*Theobroma cacao*- es una planta nativa de las regiones tropicales de América y un producto de interés económico en países como Colombia. Las características del grano de cacao son el resultado del genotipo del grano, de factores climáticos, de la geografía del lugar de siembra y del cuidado pos-cosecha. “Tres grupos principales de polifenoles se han encontrado en el cacao: catequinas, antocianinas y procianidinas, cuya característica común es una estructura de tipo flavonoide”¹⁷.

Finalmente, aprovechando que el cacao es una planta de explotación agrícola en la región, se plantea realizar avances en una temática propuesta en el Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UIS –CICTA ante la importancia de obtener extractos purificados de polifenoles para diversos usos en campos como el alimenticio, farmacéutico y cosmético. Se propone la implementación de un estudio para extraer las metilxantinas del extracto polifenoles+metilxantinas, haciendo uso de la extracción líquido-líquido (LLS). El estudio se concentrará en obtener información concerniente a las condiciones de operación (pH, temperatura, relación volumétrica, composición de las fases y número de etapas) para poder en trabajos futuros tomarlas como base en la implementación de la técnica de contactores a membrana, ya que se basan en el mismo principio de extracción, con el factor diferenciador de introducir una

¹⁶ CARRILLO, Luis. LONDOÑO, Julián y GIL, Andrés. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. En: Food Research International. May, 2014. vol. 60. p. 273-280

¹⁷ WOLLGAST, J And ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*. Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. En: Food Research International. July, 2000. vol. 33. p. 423-447

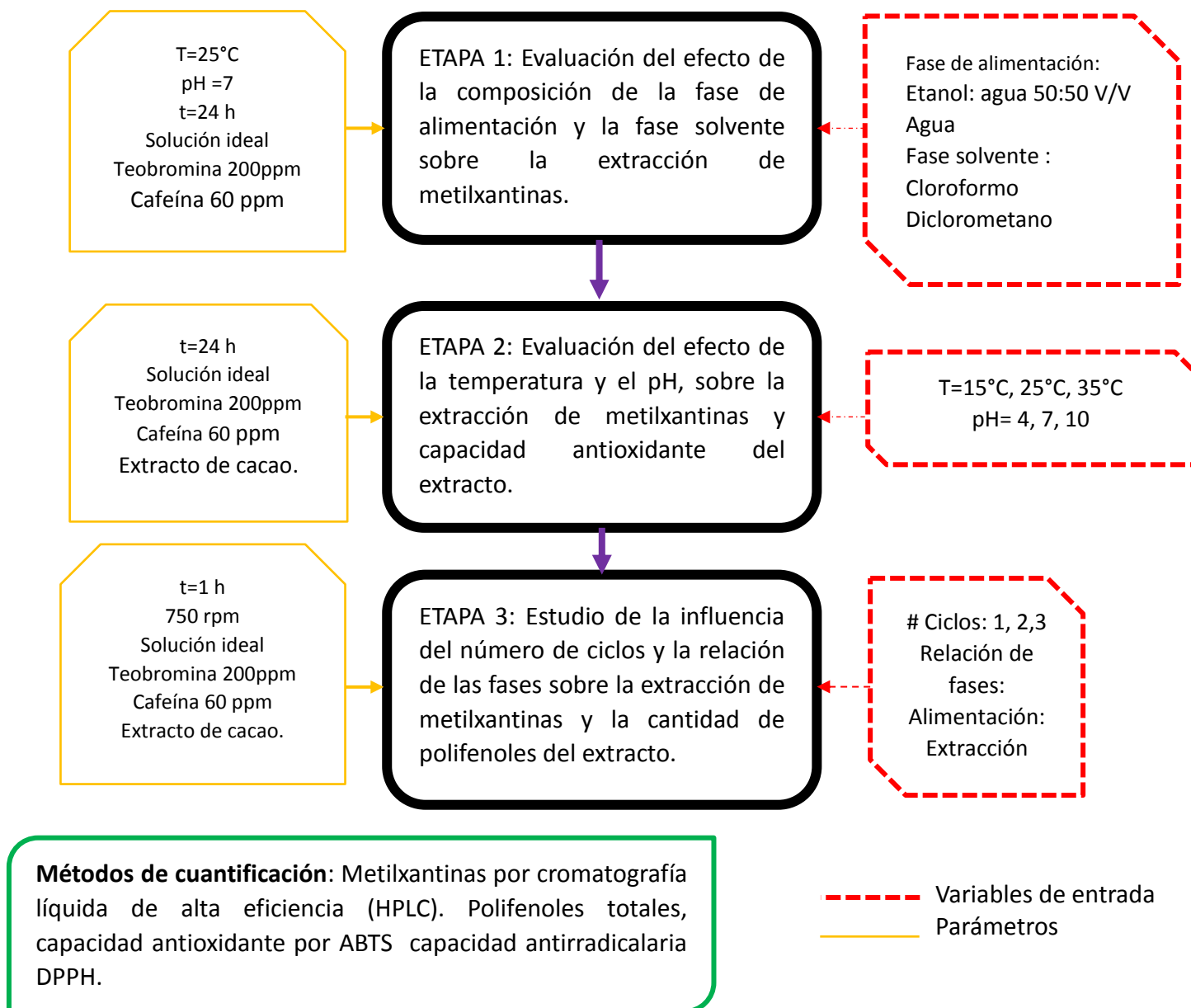
membrana que funciona como una barrera activa que reduce las probabilidades de presentar emulsiones entre las fases, “de tal manera con esta técnica no se presentarían trazas en el producto final bajo ciertas condiciones de operación, independientemente de la sustancia que se use como agente extractor”¹⁸. Este trabajo permitirá separar los polifenoles, cuya biodisponibilidad en el cuerpo está asociada con los efectos benéficos mencionados con anterioridad y como consecuencia pensar que en un futuro cercano, los polifenoles purificados sean formulados en productos de las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica.

¹⁸ LÓPEZ MENDOZA, L. y NUÑEZ, Karen. Evaluación de la técnica "Contactores a membrana" para extracción de acetona, butanol y etanol de soluciones acuosas ideales. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2013. 120 p.

1. METODOLOGÍA

En la Figura 1, se presenta de manera esquemática las etapas metodológicas consideradas en el desarrollo del presente trabajo. En las siguientes secciones se explica cada una de ellas

Figura 1. Cuadro metodológico



Todas las variables estudiadas tuvieron como finalidad aumentar los coeficientes de partición de metilxantinas, minimizando las pérdidas de polifenoles y su capacidad antioxidante.

1.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE DE ALIMENTACIÓN Y DE EXTRACCIÓN SOBRE LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS

En esta etapa se evaluaron dos niveles para los solventes tanto para la fase de alimentación (100% agua y 50:50 etanol:agua) como para la de extracción (Diclorometano y Cloroformo). Para determinar la fase de extracción se realizó una revisión bibliográfica, “la cual mostró como potenciales extractores de metilxantinas al cloroformo y al diclorometano”¹⁹. Para la fase de alimentación se tuvo en cuenta que el extracto con el cual se trabajó tenía composición 50% etanol: 50% agua, por tanto, esa fue una de las composiciones a evaluar. Sin embargo, “los solventes de extracción presentan afinidad hacia el etanol”²⁰, y por ello se decidió evaluar también la fase de alimentación 100% agua.

La fase de alimentación para esta etapa fue preparada con teobromina y cafeína a 200 y 40 ppm, respectivamente, que son concentraciones similares a las encontradas en el extracto de cacao. La temperatura de experimentación fue 25°C, la cual se garantizó con la ayuda de un baño termostático. En pruebas preliminares se determinó que a 25°C el equilibrio de extracción entre las fases se alcanzaba con 12 h (sin agitación), por ello el tiempo se duplicó para garantizar el equilibrio. El pH en la alimentación fue 7, debido a que el extracto de cacao se encuentra en este valor.

¹⁹ WAN JOO, Kim, et al. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction. En: Journal of Food Engineering. December, 2008. vol. 89. p. 303-309

²⁰ JUDSON, King. Procesos de separación. España: Reverté, 1979. 413 p. ISBN 84-291-7301-3

Las pruebas se realizaron por duplicado y se tomaron muestras solo al final de la prueba, con el fin de cuantificar teobromina y cafeína.

1.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL PH, SOBRE LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO

“Es sabido que el equilibrio entre las fases tiene una fuerte dependencia de la temperatura y el pH”²¹. La finalidad de esta etapa fue encontrar las mejores condiciones de pH y temperatura para alcanzar los mayores coeficientes de partición de metilxantinas (teobromina y cafeína) y presentar las menores pérdidas de polifenoles totales y su capacidad antioxidante. En la Tabla 1 se encuentran los niveles y factores utilizados en el diseño experimental.

Tabla 1. Niveles y factores utilizados para el diseño de experimentos de la Etapa 2

Factor/Nivel	Alto	Medio	Bajo
Temperatura [°C]	35	25	15
pH	10	7	4

“El nivel más alto para la temperatura fue 35°C debido a que a valores superiores se podrían degradar los polifenoles para los tiempos de experimentación”²². Además, para el estudio de la temperatura se utilizaron soluciones preparadas de

²¹ FIGUERUELO, Juan y DÁVILA, Martin. Química Física del medio ambiente y de los procesos medio ambientales. Barcelona: Reverté, 2004. 596 p. ISBN 84-291-7903-8

²² VERGARA SALINAS, J, et al. Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). En: Agriculture food chem. October, 2012. vol. 44. p. 20-29.

cafeína y teobromina. Sin embargo, para determinar si existe termo-degradación de polifenoles, se determinó su contenido total en el extracto de cacao después de 24 y 40 h de incubación, iniciando la evaluación a 35°C.

El pH se evaluó para valores de 4,7 y 10 en el extracto de cacao, ya que Mriganka, et al.²³, reportaron que los polifenoles permanecen prácticamente sin disociarse hasta pH 7 y a valores superiores se disocian en gran medida, lo cual se ve reflejado en las concentraciones en el equilibrio.

1.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL NÚMERO DE CICLOS Y LA RELACIÓN DE LAS FASES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO

Usando las condiciones encontradas en las etapas previas, se estudió el efecto de 3 ciclos y la relación volumétrica entre fases alimentación extracción, los niveles fueron (1:0,5, 1:1, 1:2, 1:3). Para los ciclos 2 y 3 se utilizó 80% (v/v) de solvente nuevo y 20% (v/v) de solvente recuperado de la etapa anterior. Este estudio se hizo con la finalidad de encontrar el número de etapas apropiadas para obtener un alto grado de separación de metilxantinas, y utilizar la menor cantidad de solvente para obtener la mejor extracción conservando los polifenoles en el extracto de cacao.

1.4 MATERIALES Y MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Reactivos: Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron los siguientes reactivos: Metanol al 99,8% de pureza, etanol absoluto al 99,9% de pureza, cloroformo al 99%

²³ MRIGANKA SEKHAR, M, et al. Transportation of Catechin (\pm C) Using Physiologically Benign Vegetable Oil As Liquid Membrane. En: I&EC. November, 2012. vol. 51. p. 15207–15216

de pureza, diclorometano al 99,8% de pureza, ABTSTM Chromophore Diammonium salt de marca Calbluchem®, 2,2 Diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) de marca Sigma®, Teobromina marca Sigma®, 1,3,7-trimetilxantine marca Fluka Analytical®, Peroxodisulfato de potasio marca Merck®, (\pm) 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchrome-2-carboxylic (trolox) acid , fólín ciocalceu marca Sigma®, ácido gálico marca Merck®, carbonato de sodio marca Merck®, extracto de cacao obtenido de clon ICS-39 según el procedimiento de Godoy., 2015.

Equipos de laboratorio: espectrofotómetro Genesys 20 marca Thermo spectronic®, HPLC Dionex ultimate 3000. Thermo Scientific con detector UV-Vis, balanza analítica AB204-S marca Mettler-Toledo®, agitador vortex schottGerate, baño termostataado marca Lauda® Alpha RA 24, pH-metro marca Hanna®, agitador Heidolph VIBRAMAX 100.

1.4.1 Métodos de cuantificación

Determinación de polifenoles totales (PT): El contenido de polifenoles totales fue determinado usando la metodología propuesta por Piombo²⁴. En un tubo se adicionan 50µL de la muestra o el patrón, seguidamente se agrega 1,5 ml de reactivo de folin 1:10 (v/v), luego se agita durante 10 s y se agrega 1,5 ml de carbonato de sodio 7,5%p/p se leen las absorbancias a 760nm. (para procedimiento completo ver Anexo A). Las unidades de PT fueron expresadas en miligramo de equivalente ácido gálico sobre miligramo de cacao seco (mgEAG/mg cacao seco)

²⁴ PIOMBO, G. Détermination des phénols totaux. Procédure Opérationnelle. París: CIRAD, 2007. 23 p.

Capacidad antioxidante (ABTS): siguiendo el método espectrofotométrico propuesto por Belščak²⁵. El cual consiste en preparar una solución de ABTS (7mM) y peroxodisulfato de potasio (140mM) en agua. Luego de ajustar la absorbancia de dicha solución en $0,70 \pm 0,02$ medida a 734nm, se procede a leer las absorbancias para las muestras de análisis de las cuales se añade 100µL en un tubo y se agregan 2 mL de la solución de ABTS, luego de 6 minutos se lee su absorbancia. (para procedimiento completo ver Anexo B). Las unidades se expresaron en mili-mol (mM) Trolox sobre gramo de cacao seco (mM trolox/g cacao seco).

Capacidad antiradicaarial (DPPH): con la metodología de Brand²⁶, la cual consistió en preparar una solución de 60 mM de DPPH, de la cual se añadieron 3,9 ml por cada 100µL de muestra a analizar, seguidamente se dejó en oscuridad durante 30 minutos y se leyó la absorbancia a 515nm. (para procedimiento completo ver Anexo C) Las unidades se expresaron en mili-mol trolox sobre gramo de cacao seco (mM trolox/g cacao seco)

Metilxantinas: para la cuantificación de cafeína y teobromina se empleó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), según el protocolo del laboratorio CICTA, el cual fue validado por Ayala²⁷. Se expresaron las concentraciones en mg de cafeína o teobromina sobre g de cacao seco.

²⁵ BELŠČAK, Ana. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. En: Food Research International. June, 2009. vol. 42. p. 707-716

²⁶ BRAND, Williams. CUVELIER, J. and BERSET, H. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. En: u.Technol. May, 1995. vol. 28. p. 25-30

²⁷ AYALA, German. Validación de un método para la determinación de flavonoides y metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2014. 85 p.

Coeficientes de partición: las concentraciones se midieron sobre la fase de alimentación. Para determinar la concentración en la fase de extracción, se encontró la diferencia entre la concentración al final de la prueba y la concentración inicial. Para corroborar que no se presentaran pérdidas se hizo un control a cada prueba, dicho control se basó en un balón con solo fase de alimentación. Al final de las pruebas todos los controles marcaron la misma concentración inicial, por tanto no se presentaron pérdidas por degradación debido a condiciones del ambiente.

Porcentaje de extracción de metilxantinas totales: se cuantificó el porcentaje de extracción de cada metilxantina por separado, haciendo uso de la ecuación 1, para la cual las concentraciones tienen unidades de mg/L. “Seguidamente se tuvo en cuenta la contribución de cada metilxantina en el extracto (77% teobromina 23% cafeína) y se dedujo la ecuación 2”²⁸.

$$\%Extracción = \left(1 - \frac{C_{final}}{C_{inicial}}\right) * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\%E \text{ metilxantinas totales} = 0,23 * \%Ext \text{ Cafeína} + 0,77 * \%Ext \text{ Teobromina} \quad \text{Ecuación 2}$$

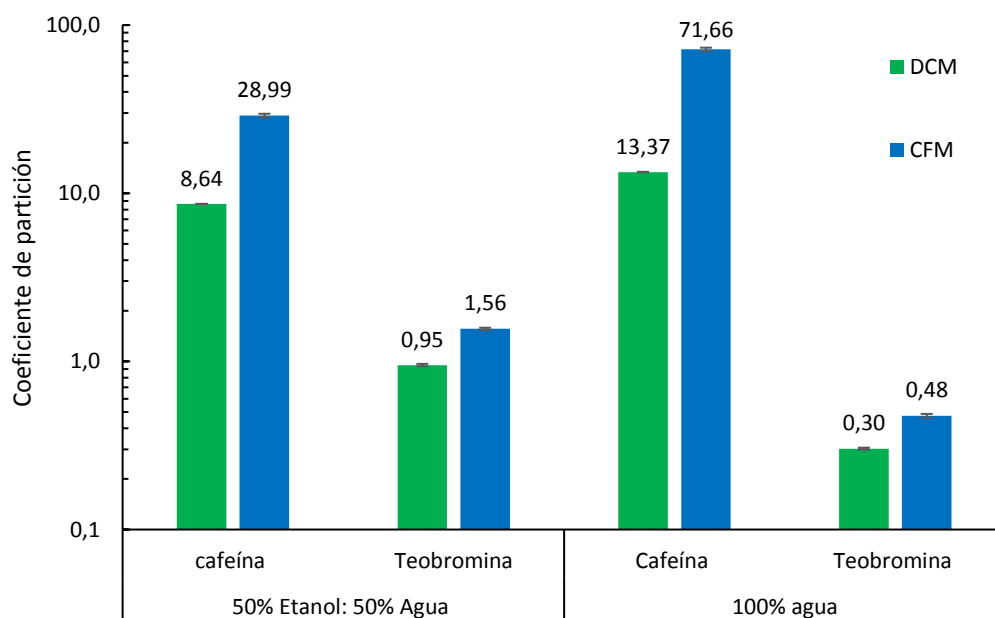
²⁸ CARRILLO, Luis. LONDOÑO, Julián y GIL, Andrés. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. En: Food Research International. May, 2014. vol. 60. p. 273-280

2. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

2.1 EFECTO DE LA COMPOSICIÓN DE LAS FASES DE ALIMENTACIÓN Y SOLVENTE SOBRE LOS COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE TEOBROMINA Y DE CAFEÍNA

Los coeficientes de partición (P) encontrados para las metilxantinas al evaluar etanol:agua 50:50 como solvente en la fase de alimentación y solamente agua, con cloroformo y diclorometano como solventes de extracción, se encuentran en la Figura 2.

Figura 2. Coeficientes de partición de metilxantinas, fase de alimentación solución teobromina y cafeína en etanol:agua 50:50 y 100% agua, usando cloroformo (CFM) y diclorometano (DCM) como solventes de extracción T=25°C; pH= 7; sin agitación. *desviaciones medias



De ella se puede observar que usando como fase de alimentación agua, los coeficientes de partición (P) de la cafeína para cloroformo (CFM) y diclorometano (DCM) fueron $71,66 \pm 1,73$ y $13,37 \pm 0,04$, respectivamente, mientras que usando etanol:agua 50:50, los coeficientes (P) fueron $28,99 \pm 0,70$ (CFM) y $8,64 \pm 0,01$ (DCM). En base a los anteriores resultados, se puede observar que los coeficientes (P) para cafeína fueron mayores cuando se utilizó como fase de alimentación únicamente agua (2,47 y 1,54 veces para CFM y DCM superiores, respectivamente). El comportamiento fue contrario para la teobromina al utilizar diferente fase de alimentación; los coeficientes de partición (P) usando etanol:agua 50:50 fueron $1,56 \pm 0,02$ (CFM) y $0,95 \pm 0,01$ (DCM). Por otro lado, usando agua como fase de alimentación se obtuvieron coeficientes (P) de $0,48 \pm 0,01$ (CFM) y $0,30 \pm 0,00$ (DCM). Esto representa un incremento de 3,25 y 3,16 veces entre los coeficientes de partición (P) para la teobromina en solución etanol:agua 50:50 usando el CFM y el DCM, respectivamente.

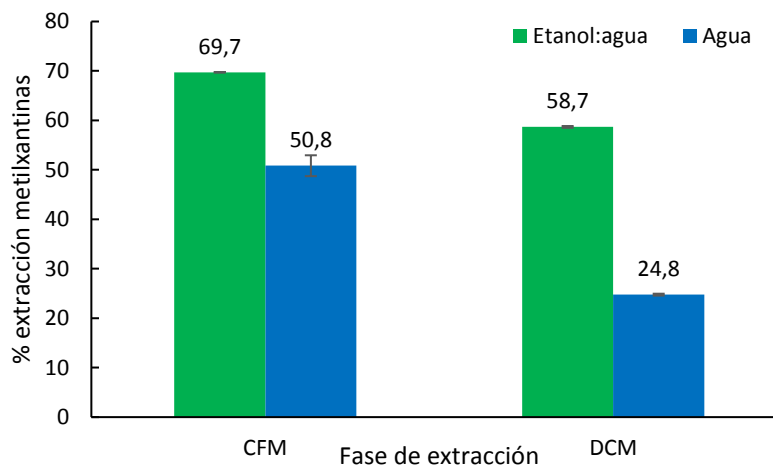
La mayor afinidad de la cafeína por el agua y de la teobromina por el cloroformo y el diclorometano fue explicada por Tarka y Hurst²⁹, quienes reportaron que las metilxantinas que tienen los átomos de nitrógeno de los heterociclos metilados (cafeína y teofilina), presentan solubilidades mayores en solventes polares que las que no los tienen (teobromina). Los mismos estudios indican que dicho comportamiento se debe a las fuerzas intermoleculares de los enlaces de hidrógeno de los alcaloides no metilados.

El interés de este proyecto es eliminar las metilxantinas totales (cafeína + teobromina) de los extractos de cacao. Por tal motivo, se cuantificaron los porcentajes de extracción (PE) de dicha familia de moléculas. Los PE para las metilxantinas totales, usando soluciones preparadas de cafeína y teobromina en

²⁹ TARKA, Stanley and HURST, Jeffrey. Introduction to the chemistry, Isolation, and biosynthesis of methylxanthines. New York: CRC press. 1998. 384 p.

etanol:agua 50:50 y solo agua como fase de alimentación con CFM y DCM como agentes de extracción se muestran en la Figura 3

Figura 3. Porcentajes de extracción de metilxantinas, variando la fase de alimentación y de extracción. Relación volumétrica igual a uno (1), T=25°C, pH=[6,3-7,2], sin agitación. *Desviaciones medias



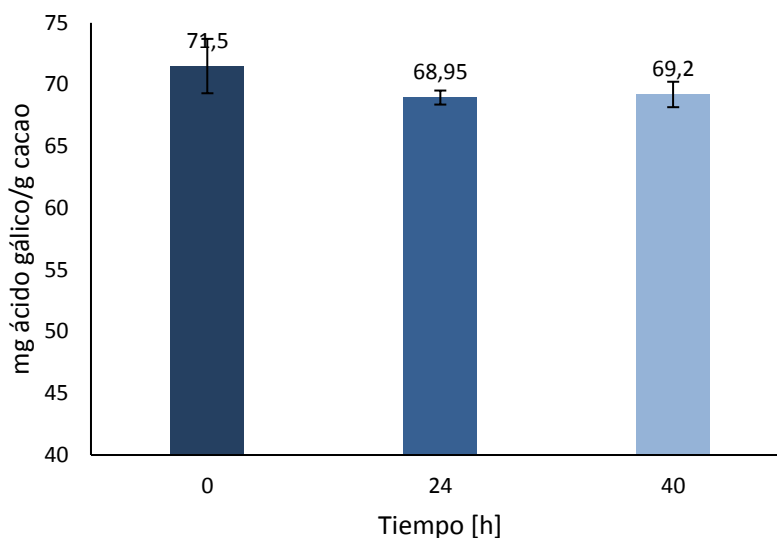
Se observa que los PE en fase de alimentación etanol:agua para CFM y DCM fueron $69,72 \pm 0,03$ y $58,68 \pm 0,18$, respectivamente. Mientras que para solo agua los PE fueron $50,84 \pm 2,11$ y $24,77 \pm 0,19$. Aunque los coeficientes (P) de cafeína son mucho mayores que los de teobromina, esta última tiene mayor influencia sobre los PE de metilxantinas totales. “Esto se debe principalmente a que en el cacao utilizado en este trabajo (clon ICS-39), la teobromina es la metilxantina mayoritaria con una relación de 3:1 con respecto a la cafeína”³⁰.

³⁰ PEREA, Aide, et al. Características de calidad del cacao de Colombia. Catálogo de 26 cultivares. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2013. 120 p.

2.2 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA EXTRACCIÓN DE CAFEÍNA Y TEOBROMINA Y LA CANTIDAD DE POLIFENOLES TOTALES EN EL EXTRACTO DE CACAO

En la Figura 4 se muestra el efecto de la temperatura a 35°C sobre los polifenoles totales del extracto. En ella se observa una reducción del contenido de polifenoles totales de solamente el 3,22±1,41 % después de 40 h. Las temperaturas de 25°C y 15°C no fueron evaluadas, “considerando que a 35°C se esperaría la mayor pérdida al ser los polifenoles sustancias termolábiles”³¹.

Figura 4. Efecto del tiempo sobre la cantidad polifenoles totales del extracto de cacao, evaluado a temperatura de 35°C, pH=7. *Desviación media



En la Figura 5 se muestran los coeficientes de partición (P) de cafeína evaluados para temperaturas de 15°C, 25°C y 35°C, usando cloroformo (CFM) y diclorometano (DCM) como fase de extracción, y soluciones preparadas de cafeína (40 ppm) y

³¹ HEMINGWAY, Richard and LAKS, Peter. Plant polyphenol, synthesis, properties and significances. New York, McGraw Hill, 1992. 1053 p.

teobromina (200 ppm) en etanol:agua 50:50 como fase de alimentación. Los coeficientes de partición para la teobromina bajo las mismas condiciones son mostrados en la Figura 6.

Figura 5. Coeficientes de partición (P) para cafeína, con cloroformo (CFM) y diclorometano (DCM) como agente extractor y soluciones preparadas de cafeína y teobromina en etanol:agua 50:50 como fase de alimentación, pH=7, sin agitación.

*Desviaciones medias

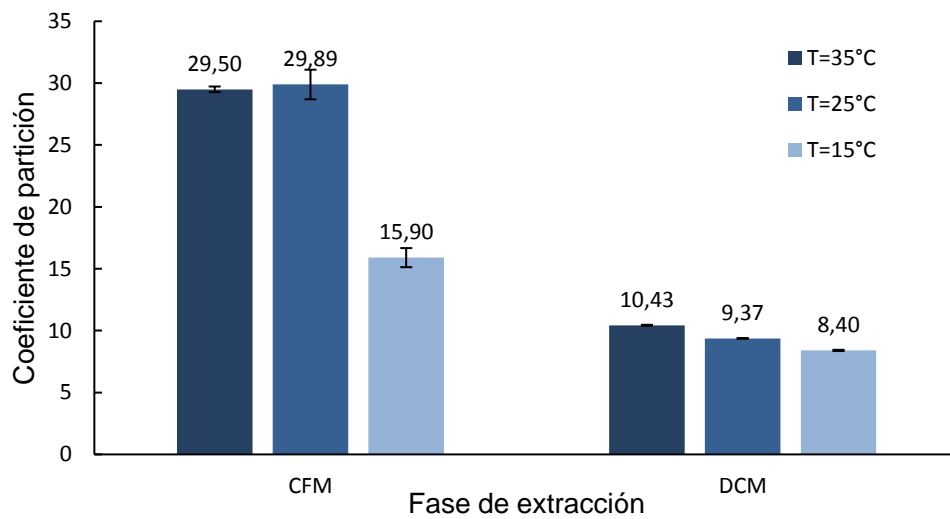
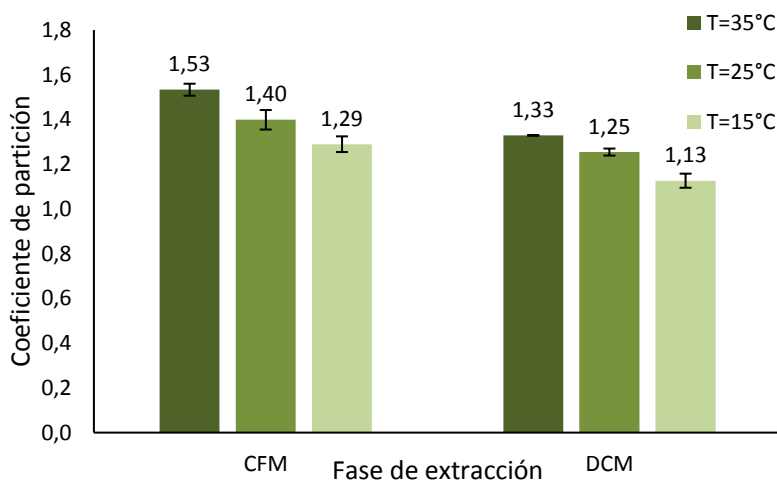


Figura 6. Coeficientes de partición (P) para teobromina con CFM y DCM como agente extractor y soluciones preparadas de cafeína y teobromina en etanol:agua 50:50 como fase de alimentación, pH=7, sin agitación. *Desviaciones medias

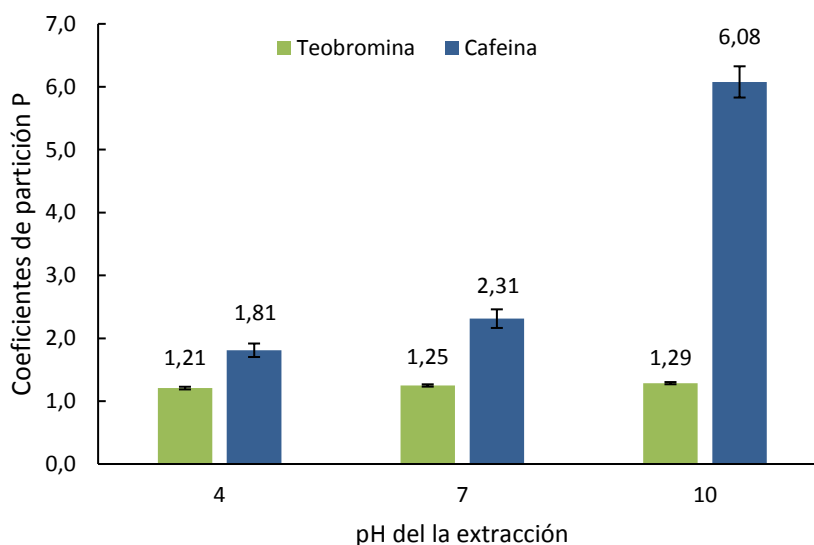


De ambas figuras se observa una relación directamente proporcional entre la temperatura y los coeficientes (P), comportamiento que fue reportado también por Brudi et al. (1996) para cafeína en el mismo rango de temperatura y usando como agente extractor dióxido de carbono. Para teobromina y cafeína se puede ver que los coeficientes de partición tendieron a aumentar a medida que la temperatura fue mayor. Usando CFM a 35°C la extracción fue $2,22 \pm 1,20$ % mayor que con 25°C, a 15°C la extracción fue $1,22 \pm 0,45$ % menor. Para DCM la extracción a 35°C fue mayor en $2,60 \pm 0,55$ % que a 25°C y a 15°C fue $4,66 \pm 1,26$ % menor. Por lo anterior, se puede concluir que para ambos solventes la máxima diferencia en la extracción de teobromina entre 25°C y 35°C fue inferior a 3,2%, y entre 25°C y 15°C fue inferior a 5%. Sin embargo, trabajar a temperatura ambiente (25°C) presenta algunas ventajas, entre ellas: los gastos energéticos se minimizan, debido a que para calentar o enfriar es necesario hacer uso de energía, además se simplifica el montaje del sistema al no necesitarse un equipo adicional para proveer o retirar calor al sistema.

2.3 EFECTO DEL PH SOBRE LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS Y CONSERVACIÓN DE POLIFENOLES EN EL EXTRACTO DE CACAO Y SU CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos para los coeficientes de partición (P) de cafeína y teobromina con pH 4, 7 y 10; usando CFM como agente extractor y extracto de cacao como fase de alimentación.

Figura 7. Coeficientes de partición de metilxantinas. Usando CFM como fase de extracción y extracto de cacao como fase de alimentación, T=25°C, sin agitación.*Desviación media



Al comparar los coeficientes (P) de esta figura con los resultados obtenidos utilizando soluciones ideales ($28,99 \pm 0,70$ -cafeína y $1,56 \pm 0,02$ -teobromina), con el mismo solvente de extracción (CFM), a pH de 7 y temperatura ambiente, para la cafeína fue $12,54 \pm 0,51$ veces mayor en soluciones ideales. Igual ocurrió con la teobromina en donde el coeficiente (P) fue $1,35 \pm 0,10$ veces mayor.

Para ambas moléculas los coeficientes de partición disminuyeron cuando la fase de alimentación cambio de soluciones preparadas a extracto de cacao, esto puede ser consecuencia de una posible interacción entre las metilxantinas y los polifenoles del extracto de cacao. Sin embargo, la disminución de los coeficientes de partición para la cafeína fue mucho mayor que para teobromina posiblemente por la presencia de grasa en el extracto (“grasa en grano de cacao (clon ICS39) $58 \pm 0,23\%$ p/p”³²). Debido a la afinidad de las grasas por los solventes no polares como los usados en este proyecto, las mismas podrían estar saturando el solvente, limitando con ello la extracción de cafeína. Teniendo como principio que la cafeína es una sustancia que se encuentra en bajas cantidades en el cacao, “la probabilidad de ser extraída en una matriz compleja disminuye si se compara con el uso de soluciones preparadas”³³. En cambio, los coeficientes de teobromina no sufren disminuciones similares a los de cafeína por dos razones: la primera, que se encuentra en mayores proporciones que la cafeína, y la segunda, que presenta menor polaridad que la cafeína (momento dipolar cafeína 3,64 Debyes y teobromina 0,411 Debyes); la polaridad podría generar interacción con las grasas, siendo arrastradas por las mismas hacia el solvente de extracción.

Por otro lado, a medida que el pH fue más alcalino, los coeficientes de partición de la cafeína y teobromina aumentaron considerablemente; como lo muestra la Figura 7. Tal cual como lo indica Vanaclocha et al.³⁴, en su libro Fitoterapia, la solubilidad de los alcaloides varía con respecto al pH; en pH ácido son solubles en medios polares y en medios básicos se solubilizan en solventes no polares.

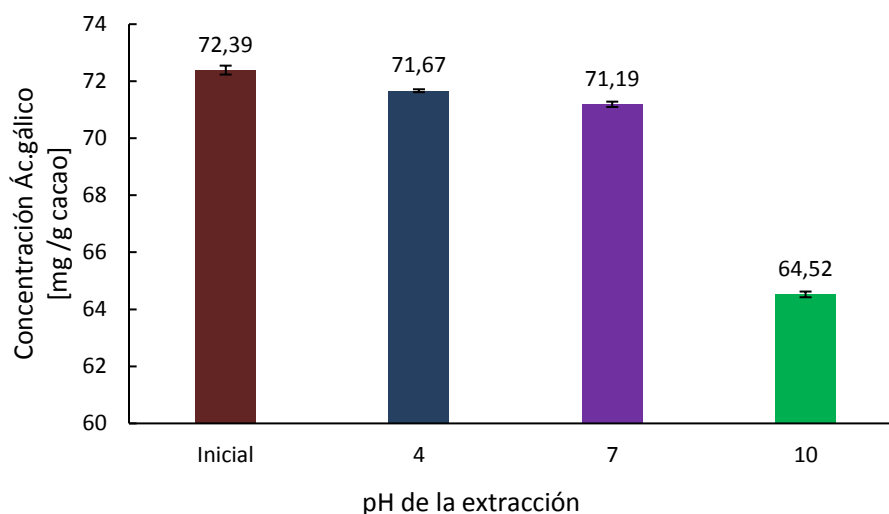
³² PEREA, Aide, et al. Características de calidad del cacao de Colombia. Catálogo de 26 cultivares. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2013. 120 p.

³³ GUARNIZO, Anderson y MARTINEZ, Pedro. Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Armenia: Ediciones Elizcom, 2003. 199 p. ISBN 978-958-97744-6-5

³⁴ VANACLOCHA, Bernat y CAÑIGUERAL, Salvador. Fitoterapia vademécum de prescripción. Barcelona: Masson, 2003. 670 p.

En la Figura 8 se muestran los valores de polifenoles totales del extracto de cacao después de la extracción de metilxantinas, para los pH evaluados en esta fase; los polifenoles totales iniciales (antes de la extracción) fueron de $72,39 \pm 0,2$ mg ácido gálico/g cacao.

Figura 8. Polifenoles totales después de la extracción de metilxantinas en función del pH. Usando cloroformo como fase de extracción y extracto de cacao como fase de alimentación, sin agitación. *Desviación media



En la Figura 8 se puede ver que la cantidad de polifenoles disminuyó cuando el pH se tornó alcalino, dicho comportamiento se puede deberse a la degradación de los mismos, “la cual generalmente ocurre como un mecanismo de oxidación acelerado por la presencia de medios alcalinos”³⁵. Este comportamiento fue corroborado al realizar los ensayos de capacidad antioxidante ABTS y capacidad anti-radical DPPH. La capacidad antioxidante para los diferentes pH evaluados se muestra en

³⁵ BOZA, Arus, et al. Preformulación de crema y ungüento a partir de un extracto seco de la corteza de mangífera indica L. En: Información tecnológica. November, 2000. vol. 11. p. 128-129. ISSN 0716-8756

la Figura 9, donde se observan los siguientes valores: $519,7 \pm 19,2$ mM trolox/g cacao seco (a pH 4); $488,6 \pm 26,5$ mM trolox/g cacao seco (a pH 7) y $332,1 \pm 0,0$ mM Trolox/g cacao seco (a pH 10). En la Figura 10 se pueden observar los valores para capacidad antiradicalaria, los cuales fueron: $431,1 \pm 4,9$ mM trolox/g cacao seco (a pH 4); $406,2 \pm 10,3$ mM trolox/g cacao seco (a pH 7) y $340,0 \pm 4,9$ mM trolox/g cacao seco (a pH 10). El extracto de cacao antes de la extracción de metilxantinas, presentó valores de capacidad antioxidante y antiradicalaria de $521,53 \pm 4,30$ mM trolox/ g cacao seco y $429,40 \pm 3,50$ mM trolox/g cacao seco, respectivamente. Los mayores porcentajes de disminución de la capacidad antioxidante se obtuvieron para pH alcalino, los porcentajes de reducción fueron: 36,32% (a pH 10); 6,31% (a pH 7) y 0,35% (a pH 4). Para capacidad antiradicalaria los porcentajes de disminución fueron 20,81% (a pH 10); 5,4% (a pH 7) y 0% (a pH 4); los cuales presentaron la misma tendencia que la capacidad antioxidante y la cantidad de polifenoles totales. Es importante mencionar que las pruebas de capacidad antioxidante y antiradicalaria en este proyecto se realizaron en medios acuosos. Sin embargo, se deben evaluar en medios emulsionados e in vivo, que son en los que finalmente se utilizarán los polifenoles purificados.

Figura 9. Capacidad antioxidante por el método ABTS, después de la extracción de metilxantinas en función del pH. Usando cloroformo como fase de extracción y extracto de cacao como fase de alimentación, sin agitación. *Desviación media

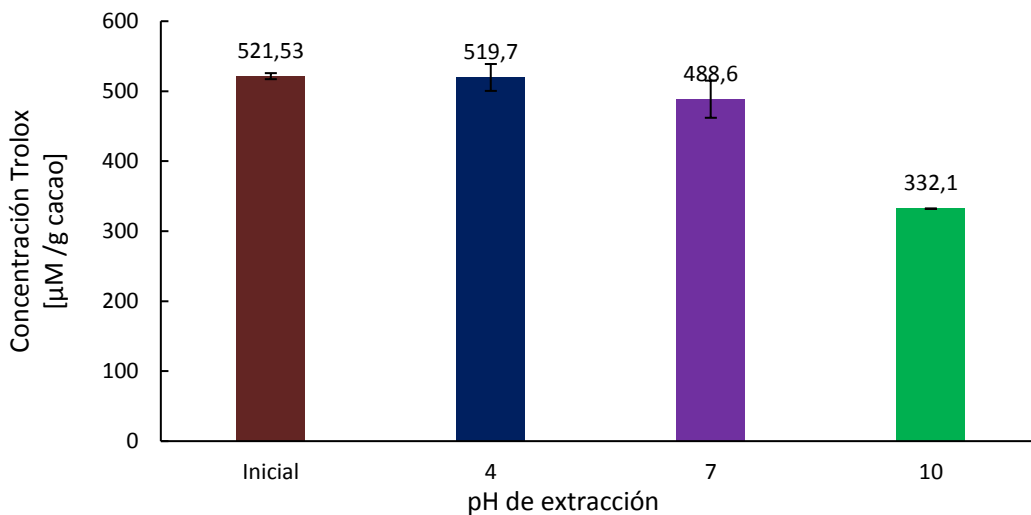
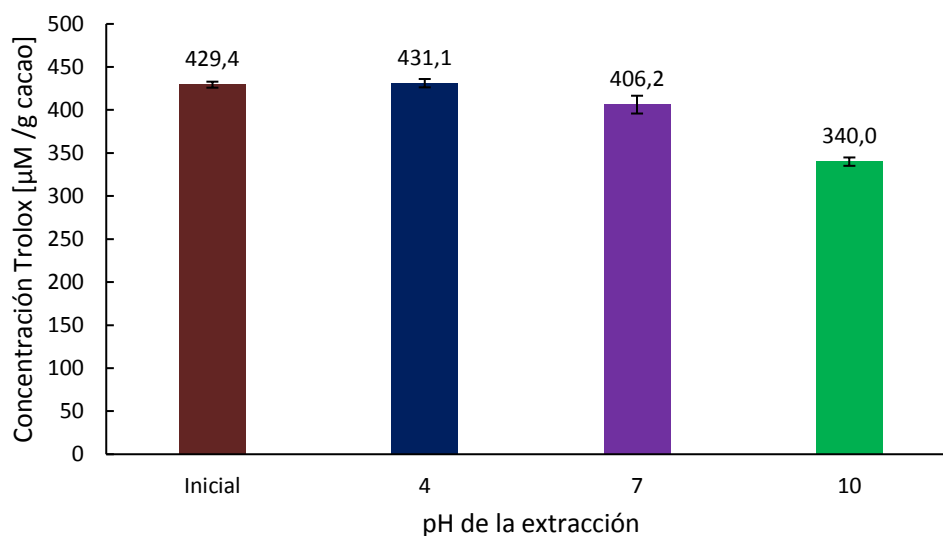


Figura 10. Capacidad anti-radical por el método de DPPH, después de la extracción de metilxantinas en función del pH. Usando cloroformo como fase de extracción y extracto de cacao como fase de alimentación, sin agitación. *Desviación media



2.4 INFLUENCIA DEL NÚMERO DE CICLOS Y RELACIÓN DE LAS FASES EN LA EXTRACCIÓN DE METILXANTINAS Y EL EFECTO SOBRE LOS POLIFENOLES DEL EXTRACTO DE CACAO.

En la Figura 11 se muestran las concentraciones de cafeína para diferentes relaciones de fases alimentación/extracción-DCM y el número de ciclos y en la Figura 12 se muestra los resultados del mismo estudio cambiando el agente extractor por CFM; las concentraciones se midieron en el extracto de cacao (fase de alimentación).

Figura 11. Efecto del número de ciclos y relación de fases [Alimentación/Extracción] sobre la concentración de cafeína en el extracto de cacao, usando DCM como agente de extracción. T=25°C, pH=7, sin agitación. *Desviaciones medias

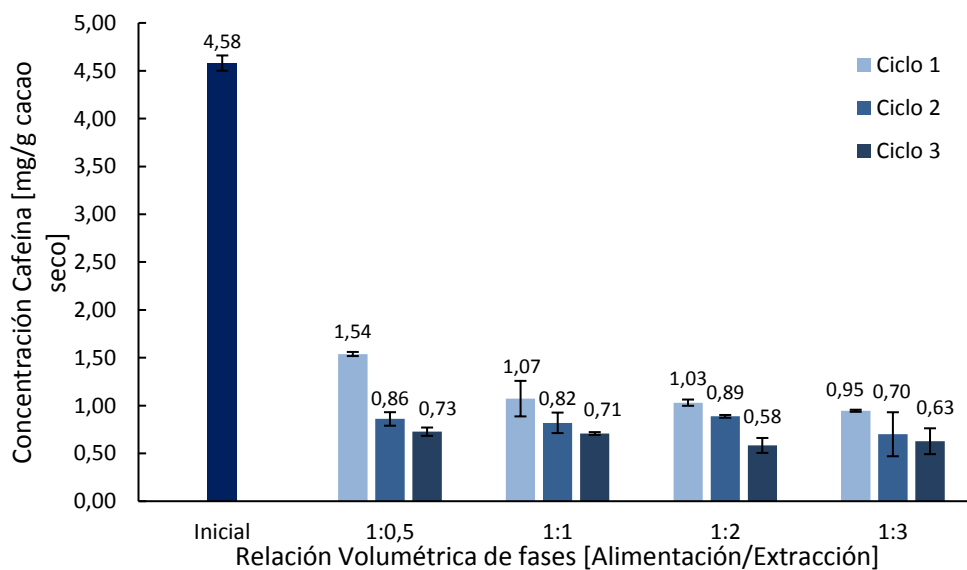
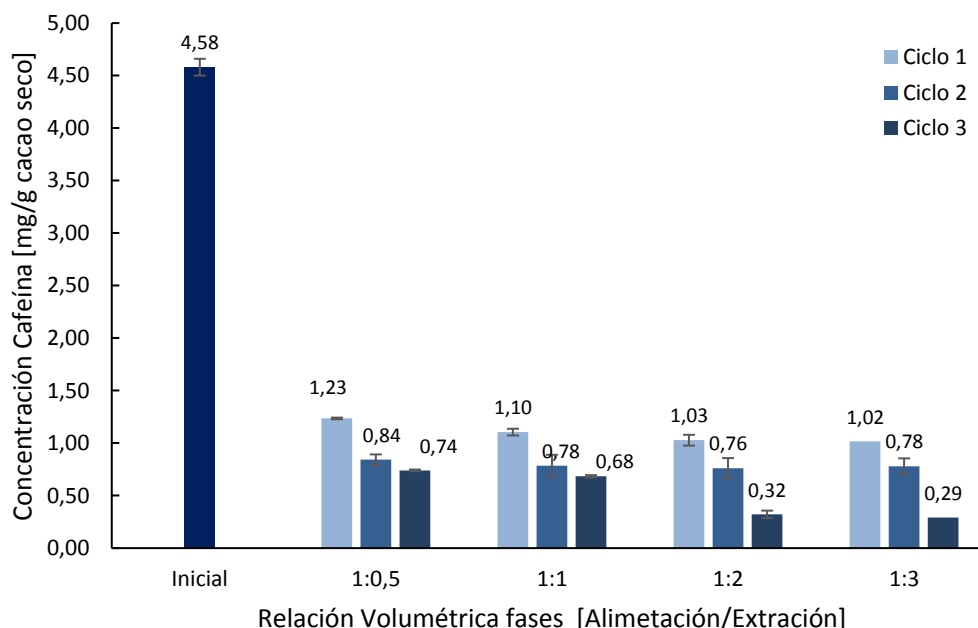


Figura 12. Efecto del número de ciclos y relación de fases [Alimentación/Extracción] sobre la concentración de cafeína en el extracto de cacao, usando CFM como agente de extracción. T=25°C, pH=7, sin agitación. *Desviaciones medias



De las Figuras 11 y 12 se observa que al aumentar la cantidad de solvente y el número de ciclos, se disminuye la cantidad de cafeína en el extracto de cacao. Se obtuvieron concentraciones finales similares cuando el descafeinado se realizó con relación 1:0,5-3 ciclos y con relación 1:3-2 ciclos, lo cual reduciría el uso de solvente en 75%. También se observa que no se logró eliminar en su totalidad la cafeína con ninguno de los solventes y la concentración final de cafeína para DCM fue $0,66 \pm 0,05$ y usando CFM fue $0,50 \pm 0,20$.

De la misma manera, en la Figura 13 se muestra el efecto de los ciclos y el cambio de relación de volúmenes para teobromina usando DCM y en la Figura 14 usando CFM.

Figura 13. Efecto del número de ciclos y relación de fases [Alimentación/Extracción] sobre la concentración de teobromina en el extracto de cacao, usando DCM como agente de extracción. T=25°C, pH=7, sin agitación. *Desviaciones medias

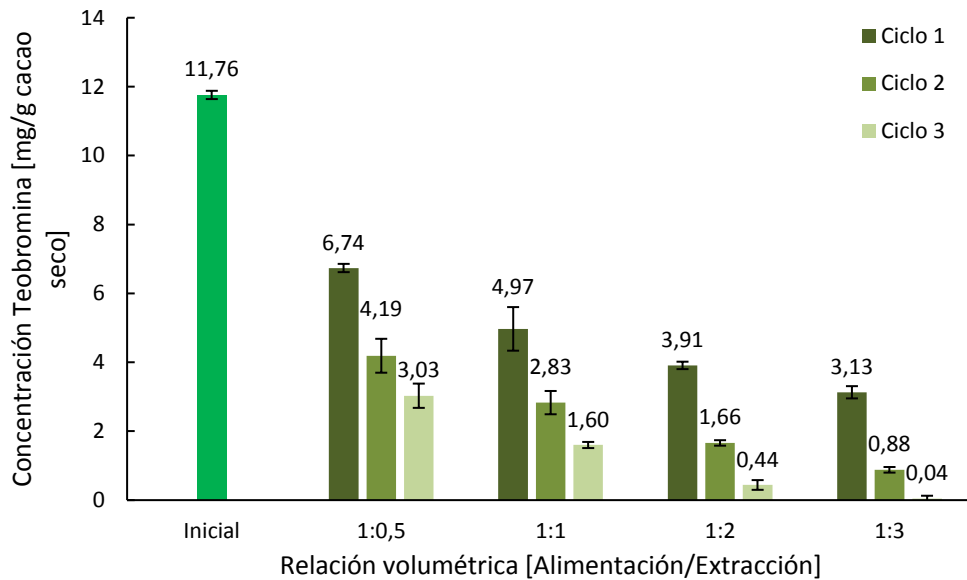
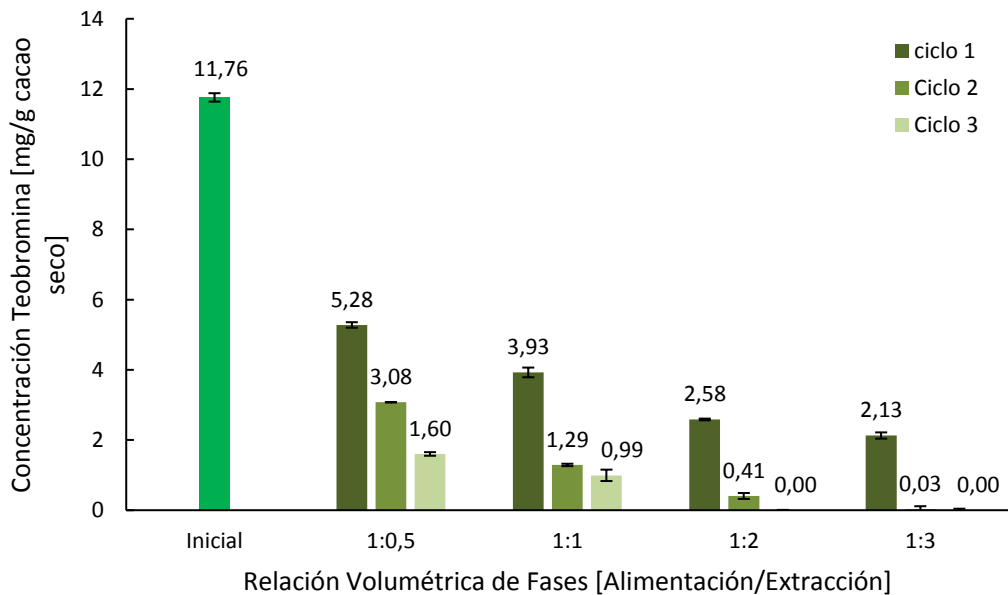


Figura 14. Efecto del número de ciclos y relación de fases [Alimentación/Extracción] sobre la concentración de teobromina en el extracto de cacao, usando CFM como agente de extracción. T=25°C, pH=7, sin agitación. *Desviaciones medias



Las Figuras 13 y 14 presentan el mismo comportamiento que se evidenció para la extracción de cafeína cuando se aumentó el número de ciclos y la relación volumétrica entre las fases. Además, un segundo ciclo para cualquier relación volumétrica fue más efectivo que duplicar la cantidad de solvente utilizando un solo ciclo. Un tercer ciclo para las relaciones de 1:0,5 logró extraer más teobromina que un solo ciclo para relación 1:3, de esta manera se reduciría la cantidad de solvente a utilizar hasta en un 50%. Se logró remover toda la teobromina a partir de una relación 1:2 con 3 ciclos y CFM como agente de extracción; sin embargo, con DCM fue más difícil y fue necesario utilizar los mismos 3 ciclos pero relación 1:3.

En las Tabla 2 y 3 se encuentran valores de porcentaje de extracción por mililitro para teobromina y cafeína, respectivamente, los cuales dan a conocer la productividad para cada relación de volúmenes entre las fases y sus respectivos ciclos.

Tabla 2. Porcentaje de extracción teobromina/ ml de solvente para cada relación de fases y número de ciclos, usando DCM y CFM como agentes de extracción y extracto cacao como fase de alimentación

% extracción con DCM				
	1:0,5	1:1	1:2	1:3
Ciclo 1	42,71	28,87	16,69	12,23
Ciclo 2	64,37	37,97	21,47	15,42
Ciclo 3	74,23	43,20	24,06	16,61

% extracción con CFM				
	1:0,5	1:1	1:2	1:3
Ciclo 1	55,12	33,31	19,50	13,65
Ciclo 2	73,85	44,52	24,14	16,63
Ciclo 3	86,37	45,77	25,00	16,67

En la Tabla 2 se observa que la relación volumétrica con mayor porcentaje de extracción por ml de solvente fue 1:0,5 y que la de menor eficiencia se obtuvo con relación 1:3, esto se puede deber a que inicialmente la carga de teobromina en el

extracto es alta y pequeñas cantidades de solvente se saturan fácilmente (condicionando este equilibrio), aprovechando al máximo el potencial extractor del solvente. Caso contrario, cuando la cantidad de solvente es mayor, éste no logra saturarse alcanzando el equilibrio entre las fases.

Tabla 3. Porcentaje de extracción/ ml de solvente para cada relación de fases y número de ciclos, usando DCM y CFM como agentes de extracción y extracto cacao como fase de alimentación

% de extracción/ml de DCM				
	1:0,5	1:1	1:2	1:3
Ciclo 1	66,40	38,29	19,38	13,23
Ciclo 2	81,22	41,05	20,16	14,12
Ciclo 3	84,13	42,27	21,82	14,38

% de extracción/ml de CFM				
	1:0,5	1:1	1:2	1:3
Ciclo 1	73,04	37,94	19,39	12,97
Ciclo 2	81,62	41,43	20,84	13,83
Ciclo 3	83,84	42,54	23,25	15,61

Al comparar las Tablas 2 y 3 se concluye que el segundo y tercer ciclo tuvieron mayor impacto sobre la extracción de teobromina. Sabiendo que la teobromina es la metilxantina más abundante en el extracto de cacao, se encontró que de las condiciones evaluadas en este proyecto la más adecuada para eliminar las metilxantinas serían: 3 ciclos, relación de fases 1:2 [alimentación: extracción] con CFM.

Sin embargo, debido a los altos costos de operación que traen consigo dichas condiciones, se hace necesario buscar una alternativa para obtener iguales o mejores porcentajes de extracción haciendo uso de menor cantidad de solvente. La solución podría ser utilizar varios ciclos con diferentes relaciones de fases en cada ciclo. Según los resultados se esperaría que la mejor extracción se logre utilizando inicialmente una relación pequeña entre las fases; debido a la alta carga inicial de

metilxantinas. A medida que se aumenta el número de ciclos manteniendo una relación pequeña entre las fases, el gradiente de extracción disminuye, lo cual conduce a procesos con un alto número de etapas. Por lo tanto, siempre se tendrá que aumentar la cantidad de solvente en por lo menos un ciclo.

En el año 2013 Choung et al.³⁶, removieron la cafeína del extracto de té, haciendo uso de 3 ciclos de extracción y relación volumétrica 1:1 con CFM y DCM, en dichos estudios se removió con CFM el 96,20% y con DCM 71,90%. Para el presente trabajo, bajo las mismas condiciones, se logró retirar con CFM el $85,07 \pm 0,17\%$ y el $84,53 \pm 0,32\%$ con DCM. “La diferencia entre los resultados de estos estudios radica en la composición de la fase de alimentación, al ser matrices diferentes (extractos de cacao y de té) los valores de extracción también serán diferentes”³⁷.

En las Figuras 15 y 16 se observa el comportamiento de los compuestos polifenólicos en el extracto de cacao, cuando se varió la relación volumétrica entre las fases y el número de ciclos usando DCM y CFM, respectivamente. La mayor pérdida de polifenoles no llegó a superar el 6% con cualquier relación de fases. Lo cual se considera poco, teniendo en cuenta que se logró retirar el $99,53 \pm 0,0\%$ de las metilxantinas totales para el mejor de los casos.

Para trabajos futuros en el grupo de investigación CICTA se recomienda trabajar con CFM para implementar la técnica de extracción líquido- líquido con membranas, debido a su superioridad en la extracción de metilxantinas a partir de extracto de

³⁶ CHOUNG, Myou, et al. Comparison of extraction and isolation efficiency of catechins and caffeine from green tea leaves using different solvent systems. En: International Journal of Food Science and Technology. June, 2014. vol. 49. p. 1572–1578

³⁷ VARCÁRCEL, Cases and GÓMEZ, Hens. Técnicas analíticas de separación. Barcelona: Reverté, 1998. p. 173-182

cacao. Sin embargo, para la aplicación sin membranas es importante evitar el CFM debido a su toxicidad, prefiriendo trabajar con DCM.

Figura 15. Efecto del número de ciclos y relación de volúmenes sobre los polifenoles totales usando DCM como agente de extracción

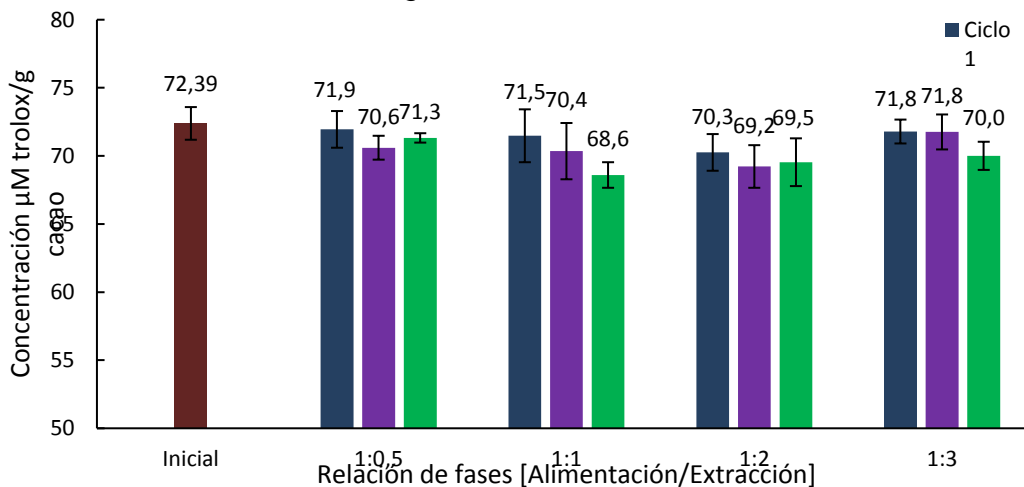
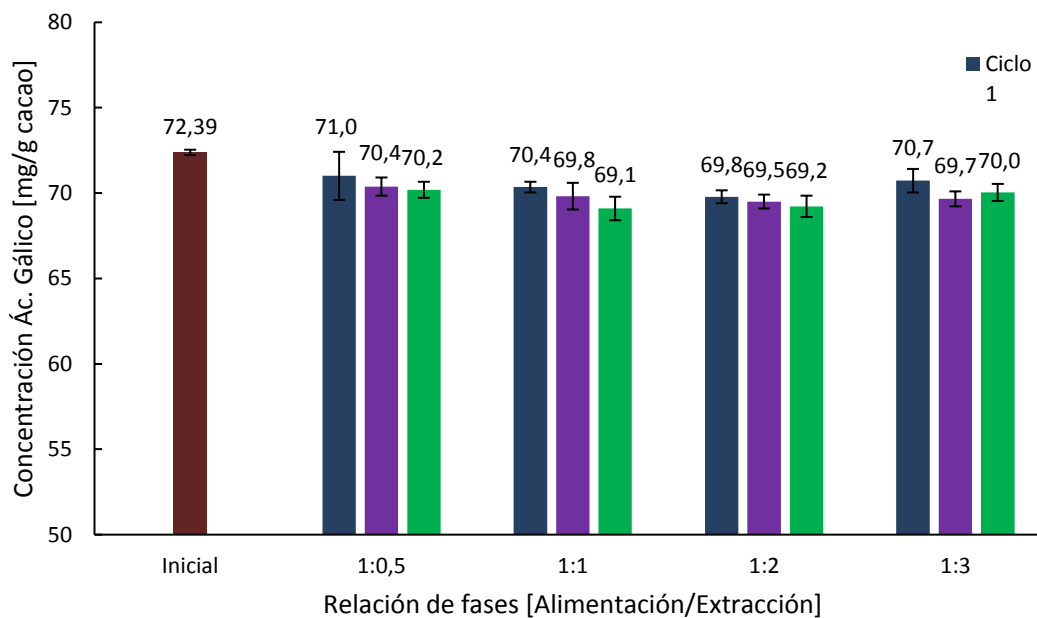


Figura 16. Efecto del número de ciclos y relación de volúmenes sobre los polifenoles totales usando CFM como agente de extracción



3. CONCLUSIONES

- Se estudió el efecto de la composición de las fases sobre la extracción de metilxantinas totales, encontrándose el mayor porcentaje de extracción (69,72%) utilizando cloroformo como solvente, soluciones preparadas en etanol:agua 50:50, relación volumétrica entre las fases 1:1, un ciclo de extracción, a 25°C y pH 7.
- Se evaluó el efecto del pH sobre la extracción de metilxantinas y la conservación de polifenoles totales. Se encontró que el pH 7 es el más adecuado para la extracción, alcanzando el 54,16% de extracción de metilxantinas totales. El efecto de la temperatura no fue relevante en la variación de los coeficientes de partición, lo que permitió trabajar a 25°C. A este pH y temperatura, las pérdidas de los polifenoles totales en el extracto fueron inferiores a 1,7%.
- Se observó una tendencia de mayor extracción de metilxantinas a medida que se aumentó la cantidad de solvente y el número de ciclos. La teobromina se logró remover en su totalidad haciendo uso de CFM con 3 ciclos, a partir de una relación volumétrica de 1:2 [alimentación: extracción]. Sin embargo, la remoción total de cafeína no fue posible en las condiciones evaluadas; el mayor porcentaje de remoción fue cercano a 94% usando CFM, relación 1:3 y 3 ciclos.
- Finalmente, se evaluó la técnica de extracción líquido-líquido a distintas condiciones, para la extracción de metilxantinas de extractos de cacao, encontrándose que las mejores fueron: solvente de extracción cloroformo, fase de alimentación etanol: agua 50:50, relación volumétrica entre las fases 1:2, pH 7, a 25°C y 3 ciclos, con las cuales se extrajo más del 99,5% de las metilxantinas totales y se perdieron menos de 3,95 % de los polifenoles totales, lo que se traduce en disminuciones de capacidad antioxidante y antiradicalaria menores de 7% y 6%, respectivamente.

4. RECOMENDACIONES

- Cuantificar la cantidad de solvente en el extracto de cacao, después de la extracción de metilxantinas.
- Optimizar la relación entre las fases en función del número de ciclos.
- Escalar el proceso de extracción líquido-líquido, comenzando por 1 litro de extracto hasta llegar a 50L.
- Implementar la tecnología de extracción líquido-líquido con membrana, para disminuir el riesgo de trazas en el producto final.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos purificados, empleando técnicas en sistemas emulsionados e in vivo.

BIBLIOGRAFÍA

AGUILAR, Manuel y CORTINA, José. Solvent extraction and liquid membrane. Fundamental and applications in new materials. Boca Raton: CCR press, 2010. 344 p.

ARRANZ MARTÍNEZ, Sara (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2010. 96 p.

AYALA, German. Validación de un método para la determinación de flavonoides y metilxantinas por cromatografía líquida de alta eficiencia. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2014. 85 p.

BELŠČAK, Ana. Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. En: Food Research International. June, 2009. vol. 42. p. 707-716

BOZA, Arus, et al. Preformulación de crema y ungüento a partir de un extracto seco de la corteza de mangifera indica L. En: Información tecnológica. November, 2000. vol. 11. p. 128-129. ISSN 0716-8756

BRAND, Williams. CUVELIER, J. and BERSET, H. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. En: u.Technol. May, 1995. vol. 28. p. 25-30

BRUDI, Karlheinz. DAHMEN, Nicolaus and SCHMIEDER, Helmut. Partition coefficients of organic substances in two-phase mixtures of water and carbon dioxide at pressures of 8 to 30 MPa and temperatures of 313 to 333 K. Karlsruhe: Institut für Technische Chemie, 1996. p. 146-151

BRUNNER, G. Gas Extraction: An Introduction to the Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes. Steinkopff: Darmstadt, 1994. 385 p.

CARRILLO, Luis. LONDOÑO, Julián y GIL, Andrés. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. En: Food Research International. May, 2014. vol. 60. p. 273-280

CHOUNG, Myou, et al. Comparison of extraction and isolation efficiency of catechins and caffeine from green tea leaves using different solvent systems. En: International Journal of Food Science and Technology. June, 2014. vol. 49. p. 1572–1578

FIGUERUELO, Juan y DÁVILA, Martín. Química Física del medio ambiente y de los procesos medio ambientales. Barcelona: Reverté, 2004. 596 p. ISBN 84-291-7903-8

GUTIÉRREZ MAYDATA, B. Chocolate, polifenoles y protección a la salud. Cuba: Farmacéutica Bonaerense, 2002. p. 149-152

GUARNIZO, Anderson y MARTINEZ, Pedro. Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida. Armenia: Ediciones Elizcom, 2003. 199 p. ISBN 978-958-97744-6-5

GODOY, Jhair. Obtención de antioxidantes a partir de grano de cacao. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2015. 96 p.

HAQQI, Tariq, et al. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. En: Proceedings of the National Academy of Sciences. May, 1999. vol. 96. p. 4524-4529

HARRIS, Daniel. Análisis químico cuantitativo. California: Friman W. H., 2003. p. 574

HEMINGWAY, Richard and LAKS, Peter. Plant polyphenol, synthesis, properties and significances. New York, McGraw Hill, 1992. 1053 p.

JUDSON, King. Procesos de separación. España: Reverté, 1979. 413 p. ISBN 84-291-7301-3

JUN JIE, Dong, et al. Isolation of antioxidant catechins from green tea and its decaffeination. En: Food and Bioproducts Processing. May, 2011. vol. 89. p. 62-66

LÓPEZ MENDOZA, L. y GARCIA, Karen. Evaluación de la técnica "Contactores a membrana" para extracción de acetona, butanol y etanol de soluciones acuosas ideales. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2013. 120 p.

MANKI, Maoela. Electroanalytical determination of catechin flavonoid in ethyl acetate extracts of medicinal plants. En: International Journal of Electrochemical Science. December, 2009. vol. 4. p. 1497-1510

MRIGANKA SEKHAR, M, et al. Transportation of Catechin (\pm C) Using Physiologically Benign Vegetable Oil As Liquid Membrane. En: I&EC. November, 2012. vol. 51. p. 15207–15216

NEAL, L. and BENOWITZ, M. Clinical Pharmacology of Caffeine. En: Annual Review of Medicine. February, 1990. vol. 41. p. 277-288

NIEMENAK, N, et al. Comparative study of different cocoa (Theobroma cacao L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. En: Journal of Food Composition and Analysis. May, 2006. vol. 18. p. 612–619

OSADA, K, et al. Tea catechins inhibit cholesterol oxidation accompanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. En: Comparative Biochemistry and Physiology. February, 2001. vol. 128. p. 153-164

PEREA, Aide, et al. Características de calidad del cacao de Colombia. Catálogo de 26 cultivares. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander, 2013. 120 p.

PIOMBO, G. Détermination des phénols totaux. Procédure Opérationnelle. Paris: CIRAD, 2007. 23 p.

RAEDERSTORFF, D, et al. Effect of EGCG on lipid absorption and plasma lipid levels in rats. United States: US National Library of Medicine, 2003. p. 326-332

RODRIGUEZ CAMPO, J, et al. Effect of fermentation time and drying temperature on volatile compounds in cocoa. En: Food Chemistry. May, 2012. vol. 132. p. 277–288.

SARMIENTO, L, et al. Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. En: Journal of Supercritical Fluids. May, 2008. vol. 45. p. 64-69

SHIOI, Yuzo, et al. Separation of Photosynthetic Pigments by High-performance Liquid Chromatography. Comparison of Column Performance, Mobile Phase, and Temperature. En: Procedia Chemistry. May, 2015. vol. 14. p. 202–210

SUDANO ROCCARO, A, et al. Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells. En: Antimicrob Agents Chemother June, 2004. vol. 48. p. 1968-1973

SUEOKA SUGANUMA, E, et al. A new function of green tea: prevention of lifestyle-related diseases. En: Ann N Y Acad Sci. April, 2001. vol. 28. p. 274-280

TARKA, Stanley and HURST, Jeffrey. Introduction to the chemistry, Isolation, and biosynthesis of methylxanthines. New York: CRC press. 1998. 384 p.

VARCÁRCEL, Cases and GÓMEZ, Hens. Técnicas analíticas de separación. Barcelona: Reverté, 1998. p. 173-182

VANACLOCHA, Bernat y CAÑIGUERAL, Salvador. Fitoterapia vademécum de prescripción. Barcelona: Masson, 2003. 670 p.

VERGARA SALINAS, J, et al. Effects of temperature and time on polyphenolic content and antioxidant activity in the pressurized hot water extraction of deodorized thyme (*Thymus vulgaris*). En: Agriculture food chem. October, 2012. vol. 44. p. 20-29.

WAN JOO, Kim, et al. Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbondioxide extraction. En: Journal of Food Engineering. December, 2008. vol. 89. p. 303-309

WOLLGAST, J And ANKLAM, E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*. Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. En: Food Research International. July, 2000. vol. 33. p. 423-447

Anexo A. Procedimiento determinación de polifenoles totales

- **Preparación curva de calibración de ácido gálico:**

pesar 0,05 g de ácido gálico (en un vaso, preferiblemente)

aforar a 25 ml el ácido gálico del paso previo, se obtendrá una solución con concentración 2 [mg/ml]

realizar las siguientes diluciones en tubos de ensayo:

Concentración	Volumen [ml] solución de 2mg/ml
2	5
1,8	4,5
1,5	3,75
1,3	3,25
1	2,5
0,5	1,25
0,25	0,625
0,125	0,3125

Las disoluciones se harán en tubos de ensayo de 5ml, el volumen que reste se afora con agua destilada.

- **Preparación reactivo de folin (1/10 v/v):**

En un balón para aforo de 25 ml se introducen 2500 microlitros de folin, luego se afora con agua destilada

Preparación solución de carbonato de sodio (7,5% p/v)

Se pesan 1,875 g de carbonato de sodio (en un vaso), afora a 25 ml

Prueba:

En tubos de ensayo adicionar 50µL de la solución patrón de ácido gálico o muestra a analizar (no olvidar el blanco)

Adicionar 1,5 ml de folin (usar vortex por 10 seg), dejar reposar 5 min Adicionar 1,5 ml de carbonato de sodio (7,5% p/v)

Dejar por una hora en oscuridad y leer absorbancia.

Anexo B. Procedimiento determinación de capacidad antioxidante por ABTS

- **Preparación solución 7mM ABTS**

Pesar en un vaso 0,096019g del reactivo de ABTS

Diluir con agua destilada y poner en ultrasonido hasta diluir completamente.

Aforar a 25 ml

Proteger de la luz con papel aluminio.

- **Preparación de solución de peroxodisulfato de potasio (140mM)**

Pesar en un vaso 0,378448 g del reactivo Diluir con ultrasonido o agitación

Aforar a 10ml

- **Preparación de la solución de peroxodisulfato de potasio al 2,45 mM**

Tomar 437,5 μ L de la solución de Peroxodisulfato y adicionarlo en un balón de aforo de 25 ml y forar con la solución de ABTS.

Dejar 16 horas a que la solución se active.

- **Curva de calibración:**

- **Solución de Trolox al 1mM**

Pesar en un vaso 0,006257 g de Trolox, diluirlos seguidamente con etanol.

Aforar a 25 ml.

Para realizar la disoluciones, preparar un balón de aforo de 5ml. Adicionar la cantidad indicada de la solución de 1mM de Trolox, la cual lo muestra la siguientes tabla y aforar con etanol (utilizando una pipeta Pasteur)

C final [mM]	Volumen inicial [μ L]	Volumen aforo etanol
1	4000	0
0,75	3000	1000
0,5	2000	2000
0,25	1000	3000
0,125	500	3500
0,0625	250	3750

Medición: La solución de ABTS se debe dividir en dos frascos con volúmenes iguales, uno de los dos se va a medir en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm. Y se adiciona etanol hasta alcanzar una absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ se deja después de la primera acomodación de la absorbancia que la solución de ABTS se estabilice por 10 minutos y se vuelve a medir si está en el rango correcto se usa el ABTS sino se ajusta la absorbancia adicionando ya sea ABTS más oscuro o etanol y se deja estabilizar por unos 10 minutos y el proceso se repite hasta tener una absorbancia en el rango y estable, en tubos de ensayo de 5ml protegidos de la luz (con cinta negra), se inyectan 100 μ L de la solución a analizar o del patrón y se le añade 2 ml de la solución de ABTS+ etanol.

Después de 6 minutos se leerán los resultados, contra un blanco de etanol.

Anexo C. Procedimiento determinación de capacidad antiradicalaria

- **Preparar una solución de Trolox 4mM**

pesar 0,0250 g de Trolox

Con un balón de aforo de 25 ml aforar con metanol absoluto.

La solución de Trolox en el balón de 25 ml se pone en ultrasonido (5 min) Se preparan disoluciones de 1;0,75;0,5;0,25;0,125 [mM]

Las disoluciones se preparan en tubos de ensayo de 5ml.

Recomendaciones: Este es un radical libre altamente cancerígeno, usar tapaboca y guantes siempre que se manipule.

Apagar la luz cuando se trabaje con el radical DPPH.

- **Preparación del DPPH**

pesar 0,0012g DPPH

Aforar a 50 ml. Se obtiene una solución 60 μ M DPPH

El balón de aforo se cubre con papel aluminio para protegerlo de la luz.

Medición: A cada cubeta de espectrofotometría se le agregan 100 μ L del estándar (trolox) o de la muestra a analizar, seguidamente se le añaden 3,9 ml de la solución 60 μ M DPPH (en metanol). Se oculta de la luz durante 30 minutos y se lee a longitud de onda de 515 [nm].