

**OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE GRANO DE CACAO:
CONDICIONES FAVORABLES DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOL
OXIDASA, EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y AJUSTE DE PARÁMETROS
CINÉTICOS**

JHAIR ENRIQUE GODOY CHIVATÁ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍA FISCOQUÍMICA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

**OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE GRANO DE CACAO:
CONDICIONES FAVORABLES DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOL
OXIDASA, EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y AJUSTE DE PARÁMETROS
CINÉTICOS**

JHAIR ENRIQUE GODOY CHIVATÁ

**Trabajo de Grado para optar el Título de:
Ingeniero Químico**

Director

Luis Javier López Giraldo, PhD

Co-Director

Said Toro Uribe, Ing. Qco.; PhD candidato

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE INGENIERÍA FISCOQUÍMICA
ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2015

A mis padres que con su ejemplo, valores y sabiduría se convirtieron en modelos a seguir y siempre han hecho esfuerzos invaluable para lograr darme lo mejor.

A mi novia e hijo quienes son mi fuente de apoyo y el motor que inspira mi corazón para continuar siempre adelante y continuar con los objetivos planeados.

A mis hermanos que siempre me han apoyado y animado en todo momento.

A mis familiares y amigos que siempre sacaron lo mejor de mí.

Jhair Godoy

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Luis Javier y el ingeniero Said Toro por su dedicación y apoyo para lograr ejecutar de la mejor forma los objetivos planteados, plasmados en excelentes resultados.

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por su apoyo económico a través del proyecto 1318.

A Fedecacao por su amable donación de las mazorcas de cacao.

A los miembros del Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos por su apoyo a lo largo de la ejecución de este trabajo.

De igual forma a la Universidad Industrial de Santander por la formación académica y apoyo a lo largo de estos años.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. MATERIALES Y METODOLOGÍA	22
1.1 METODOLOGÍA	23
1.2 MATERIALES	23
1.2.1 Reactivos.....	23
1.2.2 Materiales y Equipos	23
1.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	23
1.3.1 Fase 0: Recolección y acondicionamiento de la materia prima.	23
1.3.2 Fase 1: Estudios preliminares	24
1.3.3 Fase 2: Inactivación térmica de la enzima polifenol oxidasa	24
1.3.4 Fase 3: Cinética de oxidación de la enzima polifenol oxidasa.....	25
1.3.5 Fase 4: Extracción Sólido-Líquido de Antioxidantes	25
1.3.6 Fase 5: Cinética de extracción de antioxidantes	25
1.3. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS	26
1.4.1 Medición de la Extracción de la enzima PPO.....	26
1.4.2 Medición de la Actividad Enzimática (AE) de la enzima PPO	26
1.4.3 Medición del contenido de Proteína	26
1.4.4 Medición de Polifenoles Totales (PT).....	26
1.4.5 Medición de Flavonoides Totales (FT)	27
1.4.6 Medición de Flavan-3-oles Totales (F3T).....	27
1.4.7 Medición de la Capacidad Antioxidante (CA) por el método ORAC ...	27
1.4.8 Determinación de la capacidad antiradicalaria por DPPH.....	27
1.4.9 Medición de la capacidad antiradicalaria por el método de ABTS	28
1.4.10 Identificación y cuantificación de metilxantinas y flavanoides por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).	28
1.5 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
1.5.1 Validación de Parámetros	28
1.5.2 Análisis Estadístico	28
2. RESULTADOS	29

2.1	FASE 1: ESCOGENCIA DE PARÁMETROS PRELIMINARES	29
2.1.1	Limpieza del grano	29
2.1.2	Tipo de Secado y tiempo.....	29
2.1.3	Efecto del ultrasonido, tamaño de partícula y desengrasado sobre la concentración de PT	30
2.2	FASE 2: DISEÑO DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA PPO	31
2.3	FASE 3: PARÁMETROS CINÉTICOS DE OXIDACIÓN ENZIMA PPO ...	32
2.4	FASE 4: ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN EL SISTEMA DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO.....	34
2.4.1	Efecto de las variables del proceso sobre la extracción de polifenoles..	34
2.4.2	Cuantificación de flavonoides y metilxantinas por HPLC, capacidad antioxidante por el método de ORAC y antiradical por DPPH y ABTS.....	36
2.5	FASE 5: MODELAMIENTO CINÉTICO DE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES.....	37
3.	CONCLUSIONES	40
	BIBLIOGRAFÍA	41
	ANEXOS.....	44

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura básica de un fenol	15
Figura 2. Estructura de los monómeros principales en el cacao	17
Figura 3. Acción de la PPO sobre los compuestos fenólicos	16
Figura 4. Efecto de la enzima PPO en el tiempo	18
Figura 5. Descripción global de la metodología	22
Figura 6. Pasos de acondicionamiento de la materia prima	23
Figura 7. Relación entre la concentración de PT y la variable ω	32
Figura 8. Gráfica de Superficie de Respuesta del proceso de inhibición de la PPO	32
Figura 9. Cinética enzimática de la enzima PPO	33
Figura 10. Gráficos de superficie de respuesta para PT	35
Figura 11. Gráficos de superficies de respuesta para FT	36
Figura 12. Gráficos de superficies de respuesta para F3T	36
Figura 13. Cinéticas de extracción de antioxidantes del grano de cacao	38

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Modelos cinéticos que describen el proceso de extracción.	21
Tabla 2. Factores y niveles para el diseño de la Fase 1.	24
Tabla 3. Variables del diseño de experimentos de la extracción de PT.	25
Tabla 4. Efecto del tipo y tiempo de secado sobre PT.	29
Tabla 5. Efecto del desengrasado, tamaño de partícula sobre la concentración de PT.	30
Tabla 6. Efecto del ultrasonido sobre la concentración de polifenoles totales.	30
Tabla 7. Parámetros de oxidación de la enzima PPO para cacao.	33
Tabla 8. Variables de extracción optimizadas para la extracción de polifenoles.	34
Tabla 9. Parámetros que describen la cinética de extracción de PT.	38

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. GRÁFICO DEL DOBLE RECÍPROCO	44
ANEXO B. ANÁLISIS PRELIMINARES PREVIOS A LOS DISEÑOS DE INACTIVACIÓN Y EXTRACCIÓN	45
ANEXO C. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE PT COMO FUNCIÓN DEL % INACTIVACIÓN ENZIMÁTICO	46
ANEXO D. RESULTADOS DEL DISEÑO DE LA INACTIVACIÓN	47
ANEXO E. RESULTADOS DEL DISEÑO DE EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES	48
ANEXO F. DIAGRAMAS DE PARETO: DISEÑO DE EXPERIMENTOS	49
ANEXO G. TABLA DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA	50
ANEXO H. GRÁFICOS DE LOS EFECTOS PRICIPALES	52
ANEXO I. CURVAS DE CALIBRACIÓN	53
ANEXO J. DATOS DEL SEGUIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES: CINÉTICA	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2 'azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AE	Actividad Enzimática
AEs	Actividad Específica
AOX	Antioxidantes
CA	Capacidad Antioxidante
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
FT	Flavonoides Totales
F3T	Flavan-3-Oles Totales
Gms	Gramo de muestra Seca no Desengrasada
Km	Constante de Michaelis
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
PPO	Enzima Polifenol Oxidasa
PT	Polifenoles Totales
R ²	Coeficiente de Determinación
Tpar	Tamaño de partícula
V _{máx}	Velocidad Máxima de reacción enzimática
ω	Variable que relaciona actividad específica y concentración PT

U_{PPO}/mLmin: Una unidad de actividad enzimática de la PPO se definió como el cambio en 0,001 (a 420nm/min) por un 1,0 mL del extracto.

U_{PPO}/μg_{BSA}: La actividad específica se expresó como una unidad de actividad específica por 1,0 μg de BSA para 1,0 mL de extracto.

mgEAG/gms: miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca no desengrasada.

mgCat/gms: miligramos de equivalentes de catequina por gramo de muestra seca no desengrasada.

μmolTrolox/g_{lio}: micro moles equivalentes Trolox por gramo de muestra liofilizada.

RESUMEN

TÍTULO: OBTENCIÓN DE ANTIOXIDANTES A PARTIR DE GRANO DE CACAO: CONDICIONES FAVORABLES DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA POLIFENOL OXIDASA, EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES Y AJUSTE DE PARÁMETROS CINÉTICOS*.

AUTOR: Godoy Chivata, Jhair Enrique**

PALABRAS CLAVES: Cacao, Antioxidantes, Polifenol Oxidasa, Flavonoides, Extracción.

El presente trabajo establece una metodología para la obtención de un extracto rico en antioxidantes a partir de grano sin fermentar (genotipo ICS 39) empleando tecnologías económicas, de fácil escalamiento y libre de solventes tóxicos. En fases preliminares, se determinó que la muestra con cascarilla y secado con horno a 70°C por 3h favorece la concentración de polifenoles. Además, el empleo del ultrasonido durante 15min a 4°C, tamaño de partícula <180µm permite evitar el proceso de desengrasado. Se evaluó la inhibición y cinética de la Polifenol-Oxidasa por medio de un tratamiento térmico encontrándose que a 96°C, 70mM de una solución de ácido ascórbico:L-cisteína durante 6,36min se alcanza una inhibición del 91,32% y un total de polifenoles 94,705mgEAG/g_{ms} (p<0,05) medidos por espectrofotometría. La influencia de las variables en la extracción de antioxidantes empleando un diseño de factorial 2⁴+puntos centrales, indica que la máxima recuperación de polifenoles, flavonoides y flavan-3-oles totales es 112,37mgEAG/g_{ms}, 59,78mgCat/g_{ms}, 73,56mgCat/g_{ms}, respectivamente, los cuales se alcanzan a un pH 6, relación 1:120 m/v soluto-solvente, relación 50v/v etanol-agua a 70°C, para un equilibrio ~45min, según el ajuste de la cinética de extracción del modelo de Peleg-Modificado (R²=0.989).

El extracto polifenólico liofilizado tiene una capacidad antioxidante de 7.146,15 µmolTrolox/g_{lio} y una capacidad antiradical de 87,95% y 53,59% para DPPH y ABTS respectivamente. Por gramo liofilizado se encontró una concentración de 134,043mg teobromina, 14,798mg cafeína, 150,290mg catequina y 162,308mg epicatequina determinados por HPLC-UV:Vis. Los datos permiten establecer las condiciones favorables para la obtención de un extracto rico en antioxidantes, lo cual perfila su aplicación futura como aditivo funcional en la industria de alimentos.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ingeniería FísicoQuímicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). Director: Luis Javier López Giraldo. Ingeniero Químico, Ph.D. Co-Director: Said Toro Uribe, Ing. Qco.

ABSTRACT

TITLE: OBTAINING OF ANTIOXIDANTS FROM COCOA BEAN: FAVORABLE CONDITIONS INACTIVATING POLYPHENOL OXIDASE ENZYME, POLYPHENOL EXTRACTION AND ADJUSTMENT OF KINETIC PARAMETERS*.

AUTHOR: Godoy Chivata, Jhair Enrique**

KEY WORDS: Cocoa, Antioxidants, Polyphenol oxidase, Flavonoids, Extraction.

This research establishes an experimental procedure to obtain a rich antioxidant extract from unfermented cocoa beans (clone ICS 39) using economical, inexpensive, easy to use, readily available, robust, suitable system blocks for large-scale production and materials generally recognized as safe. According to preliminary results, the uses of entire cocoa beans and dried-oven at 70°C during 3h allowed good recovery of polyphenols. Therefore, ultrasonic-wave during 15min with a bath of 4°C with particle sample distribution <180µm avoids the defatted process. It was evaluating the inactivation of polyphenol oxidase (PPO) enzyme using a heat treatment. The major inactivation of PPO (91,32% and total polyphenols 94,705mgEAGg/g_{ms}) was found at 96°C, 70mM ascorbic acid:L-cysteine solution during 6,36min (p<0,05) measurement by spectrophotometry. According to this study of antioxidants extraction methodology employing a 2⁴+central point factorial design indicates the major recovery of total polyphenols, flavonoids and flavan-3-oles are 112,37mgEAG/g_{ms}, 59,78mgCat/g_{ms}, 73,56mgCat/g_{ms}, respectively, which are obtaining at ph 6, ration 1:120 (w/v) solute:solvent, ratio 50 (v/v) ethanol:water, 70°C to reach a equilibrium ~45min by Peleg Modified kinetic parameters (R²=0.989).

The antioxidant and antiradical capacity of the lyophilized extract are 7.146,15 µmolTrolox/g_{lio}, 87,95% y 53,59% by ORAC, DPPH and ABTS, respectively. By gram of sample are recovery a content of 134,043mg theobromine, 14,798mg caffeine, 150,290mg (+)-catechin and 162,308mg (-)-epicatechin measured by HPLC-UV:Vis. Finally, these results allow to establish the best operational conditions to obtain a rich antioxidant extract with highlights applications as functional additive in the food industry.

*Undergraduate Project

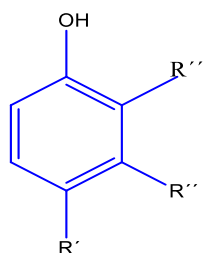
**Physical and Chemical Engineering's Faculty. School of Chemical Engineering. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). Advisor: Luis Javier López Giraldo, Chemical Engineer, Ph.D. Co-director: Said Toro Uribe, Chem. Eng.

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes demuestran que los polifenoles a partir de fuentes vegetales pueden ser beneficiosos para la salud humana, porque pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas tales como las enfermedades cardiovasculares y varios tipos de cánceres (Carnésecchi et al., 2002; Martin, Goya, & Ramos, 2013). Por esto, los productos naturales que contiene este tipo de compuestos bioactivos, podrían ser utilizados en diferentes campos de la industria para producir alimentos más funcionales y/o nutraceuticos (Bradbury & Berndt, 2011). .

Los polifenoles son metabolitos secundarios que se derivan del fenol y están compuestos de varios anillos fenólicos (Fig. 1) (Balasundram, Sundram, & Samman, 2006). Los polifenoles se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal y existen cerca de 8.000 polifenoles que se agrupan en tres grandes clases: ácidos fenólicos, flavonoides, otros (TSAO, 2010).

Figura 1. Estructura básica de un fenol donde R' , R'' , y R''' son grupos funcionales, e.g., carboxilo, glucósido, aromático, etc.



Fuente : (Toro U & Rosso C, 2011)

El mayor grupo de polifenoles, los flavonoides (Randhir, Lin, & Shetty, 2004), , se clasifican en 13 subclases, siendo las más representativas, antocianinas, flavonoles, isoflavonas, flavan-3-oles y proantocianidinas (Harborne & Baxter, 1999). . El esqueleto básico de un flavonoide se caracteriza por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres carbonos y se encuentran generalmente en forma de glucósidos (Balasundram et al., 2006). .

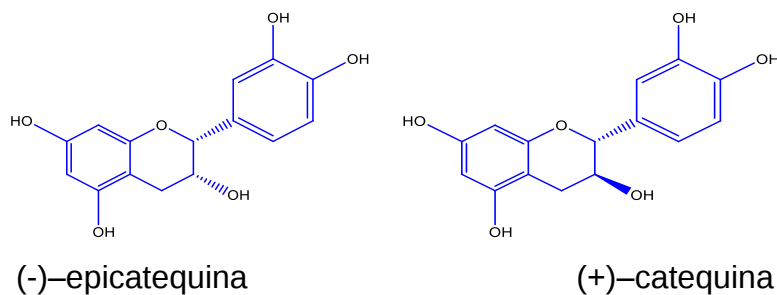
La importancia de los polifenoles en la dieta, se debe a la presencia de grupos hidroxilos unidos al anillo bencénico, que facilitan la deslocalización electrónica al disminuir la energía y la reactividad del nuevo radical formado, confiriéndole características antioxidantes al estabilizar especies reactivas de oxígeno, tales como el anión superóxido y el radical hidroxilo (Vermerris & Nicholson, 2007).

Específicamente, el cacao y sus productos son reconocidos mundialmente como el alimento más rico en polifenoles, más distribuido y de mayor aceptación, acorde al estudio de las 100 fuentes más ricas de polifenoles (Pérez-Jiménez, Neveu, Vos, & Scalbert, 2010) , en el cual los polifenoles representan hasta el 6-12% en peso seco del grano (Zumbé, 1998).

El cacao presenta diferentes variedades genéticas lo que significa diferentes perfiles fisicoquímicos y organolépticos (Pérez-Jiménez et al., 2010). En términos fisicoquímicos Sierra L & Peñaranda (2013) estudió 21 muestras de cacao comercializadas en Colombia y concluyeron con base en la capacidad antioxidante (CA) y polifenoles totales (PT) que la variedad Trinitario, ICS 39, es la más promisorio al presentar un contenido de PT de 74,47 mgEAG/g y una CA de 1.586,71µM Trolox/g.

Diferentes estudios reportan que los granos de cacao verde y sin fermentar contienen altos niveles de polifenoles, destacándose metabolitos tipo flavan-3-oles, de bajo peso molecular como lo son la (+)- catequina y (-)- epicatequina (Fig. 2), que pueden constituir el 37% de los polifenoles totales (Sotelo, Alvis, & Arrázola, 2015; Wollgast & Anklam, 2000). A su vez, los flavan-3-oles tienen la capacidad de oxidarse en formas poliméricas una vez abierta la cáscara de la mazorca contenedora de los granos, disminuyendo su bioabsorción y biodisponibilidad en el cuerpo, pero aumentando su bioactividad en la flora bacteriana (Gupta, Kagliwal, & Singhal, 2013).

Figura 2. Estructura de los principales monómeros en el cacao.



Fuente: (Wollgast, 2000).

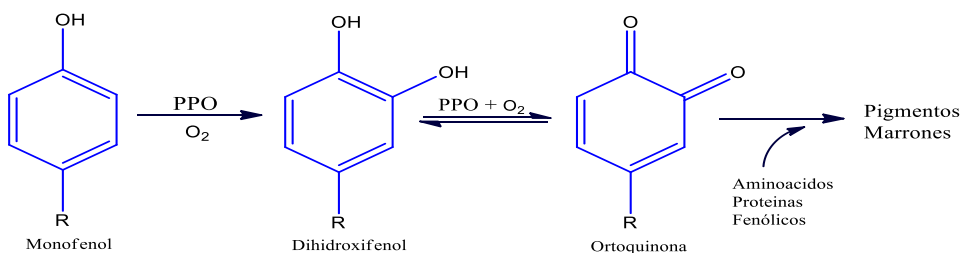
El contenido de polifenoles en el grano de cacao puede variar entre 52,86–70,1mg/g para la semilla seca (Schubert et al., 2007), en el chocolate negro 1,7 – 8,4 mg/g y en el chocolate en leche 0,7 – 5 mg/g (Wollgast & Anklam, 2000). Carrillo & et al (2014) encontró 70,90 mg/g de polifenoles en grano de cacao colombiano, donde 16,03% son flavan-3-oles, 5,08% epicatequina, 1,85% catequina, 1,330 mg/g cafeína, 8,863 mg/g teobromina.

Adicionalmente, uno de los macronutrientes más conocidos y comercializados del cacao es la manteca de cacao que puede variar desde 49 hasta un 56%, dependiendo del genotipo (Pérez, Álvarez, & Lares, 2002). No obstante, este macronutriente tiene un efecto barrera en la extracción de polifenoles, debido al carácter apolar de los lípidos presentes en el material vegetal que limita el contacto entre el solvente y los polifenoles que son compuestos polares, lo que influye en un bajo rendimiento de extracción de polifenoles.

Durante los procesos postcosecha del grano, el contenido de flavonoides disminuye en un 30% debido principalmente a los procesos de fermentación, por ejemplo, la (-)-epicatequina, se reduce en un 90% en 4 días de fermentación (Cros, Villeneuve, & Vincent, 1982; Pons-Andreu, Cienfuegos-Jovellanos, & Ibarra, 2005) por factores como, los cambios de temperatura, altos niveles de oxígeno y esencialmente por la presencia de enzimas denominadas polifenol oxidasas (PPO) que catalizan la oxidación de polifenoles en o-quinonas, las cuales a través de reacciones de Maillard se someten a polimerización espontánea que reaccionan con los

aminoácidos y las proteínas para formar compuestos de alto peso molecular o pigmentos marrones (melaninas) (TOMÁS-Barberán & ESPIN, 2001).

Figura 3. Mecanismo de oxidación de la PPO sobre los compuestos fenólicos.



Fuente: (Pourcel, Routaboul, Cheynier, Lepiniec, & Debeaujon, 2007).

Figura 4. Efecto de la enzima PPO en el tiempo..



Fuente: (Kadow, Niemenak, Rohn, & Lieberei, 2015)

Acorde a la revisión hecha a lo largo de este proyecto, las propiedades de la enzima PPO en el grano de cacao no han sido adecuadamente estudiadas, reportando solo investigaciones con resultados cualitativos medidos visualmente en una escala de color (Sierra L, 2013; Tomas-Barberán et al., 2007).

Diferentes autores reportan que la inactivación de la enzima PPO permite reducir las pérdidas de polifenoles causadas por el pardeamiento (Cheng, Zhang, & Adhikari, 2013; Mathew & Parpia, 1971). Se han reportado varios métodos y tecnologías, entre los que se encuentran la adición de agentes inhibitorios (İyidoğan & Bayındırlı, 2004), , tratamiento térmico (Marshall, Kim, & Wei, 2000) y tecnologías no convencionales (lemma et al., 1999).

Los agentes inhibitorios más comúnmente utilizados para el control son agentes sulfitos, pero debido a los efectos adversos para la salud se implementan agentes reductores (ácido ascórbico, glutatión y L-cisteína) (Rapeanu, Van Loey, Smout, & Hendrickx, 2005). Se ha encontrado que la L-cisteína y el ácido ascórbico son compuestos eficaces para prevenir la reacción de pardeamiento (İyidoğan & Bayındırlı, 2004).

Rapeanu, Van Loey, Smout, and Hendrickx (2006) encontraron que los inhibidores ácido ascórbico, L-cisteína y m-bisulfito de sodio inducen un alto grado de inhibición sobre la PPO, por ejemplo, L-cisteína es eficaz en la prevención del pardeamiento del zumo de manzana en concentraciones de 1-1,8 mM (Özoğlu & Bayındırlı, 2002) y 4 mM (İyidoğan & Bayındırlı, 2004), logrando una inactivación de la enzima por encima del 90%.

De las tecnologías de inhibición, el tratamiento térmico es el método más ampliamente utilizado para la estabilización de los alimentos debido a su propiedad de destruir los microorganismos e inactivar enzimas, denominado también como escaldado (Marshall et al., 2000). Temperaturas entre 70-100°C en cortos tiempos (1-20 min) desnaturaliza las proteínas y, por lo tanto, inactiva las enzimas al destruir su actividad catalítica, pero también causa la destrucción de nutrientes termosensibles (Chutintrasri & Noomhorm, 2006).

Dentro de las tecnologías no convencionales, se destaca la inhibición de enzimas por tratamiento de alta presión hidrostática (Hendrickx, Ludikhuyze, Van den Broeck, & Weemaes, 1998) e irradiación gamma, pero son tecnologías emergentes que representan un alto costo de implementación industrial (Iemma et al., 1999).

Adicional a la inactivación de la PPO para proteger la reducción de los polifenoles en los materiales vegetales (en nuestro caso granos de cacao), es necesario implementar una técnica de extracción de éstos metabolitos. Dentro de los métodos de extracción más utilizados para productos vegetales son la destilación al vapor, la extracción por prensado, la extracción con solventes químicos y la extracción con

CO₂ a condiciones supercríticas (SC), siendo las dos últimas las más empleadas en la recuperación de polifenoles.

Aunque la extracción por SC-CO₂, es considerada como una tecnología verde sin dejar residuos en la muestra, esta técnica se caracteriza por altos costos operacionales, bajo escalamiento y usada principalmente para separar compuestos liposolubles (Fabiani et al., 2012). En el caso de sustancias polares se requiere el uso de un co-solvente (Jaimes & Pico, 2014). Por estas razones, este proyecto emplea la extracción sólido-líquido con solventes GRAS (generalmente reconocidos como seguros), porque se constituye como una técnica de bajo costo, amplio uso de solventes y de condiciones operacionales, fácilmente escalable y de usar (Toro U & Rosso C, 2011).

La actividad antioxidante medidas por ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) en grano de cacao fermentado del clon CCN-51 de Colombia, oscila entre 365,8-625,33 μ MTrolox/g_{ms} (Noguera, 2014). Por su parte, las propiedades antiradicalarias del grano de cacao medido por DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) oscila entre 0,2-3,0 μ molTrolox/g, y por ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), oscila entre 1,0 - 9,8 μ molTrolox/g (Schinella et al., 2010).

Con base a lo expuesto anteriormente, el proyecto se enfocó en la extracción y medición cuantitativa de la actividad específica de la enzima PPO en el cacao y establecimiento de las condiciones para su inactivación.

Se determinó también, las condiciones favorables de la extracción de antioxidantes empleando solventes GRAS, para lo cual se evaluó una metodología para evitar el proceso de desengrasado que se caracteriza convencionalmente por usar disolventes tóxicos como n-hexano, éter de petróleo, etc. (Niemenak, Rohsius, Elwers, Ndoumou, & Lieberei, 2006; Risner, 2008).

Asimismo, se implementó un diseño experimental para encontrar las condiciones favorables de extracción de los polifenoles, flavanoides y flavan-3-oles totales,

debido a que la liberación de éstos, está influenciada por la temperatura, método y tiempo de extracción, tipo y relación entre solventes, relación soluto-solvente, tamaño de partícula y pH de extracción (Chirinos, Rogez, Campos, Pedreschi, & Larondelle, 2007).

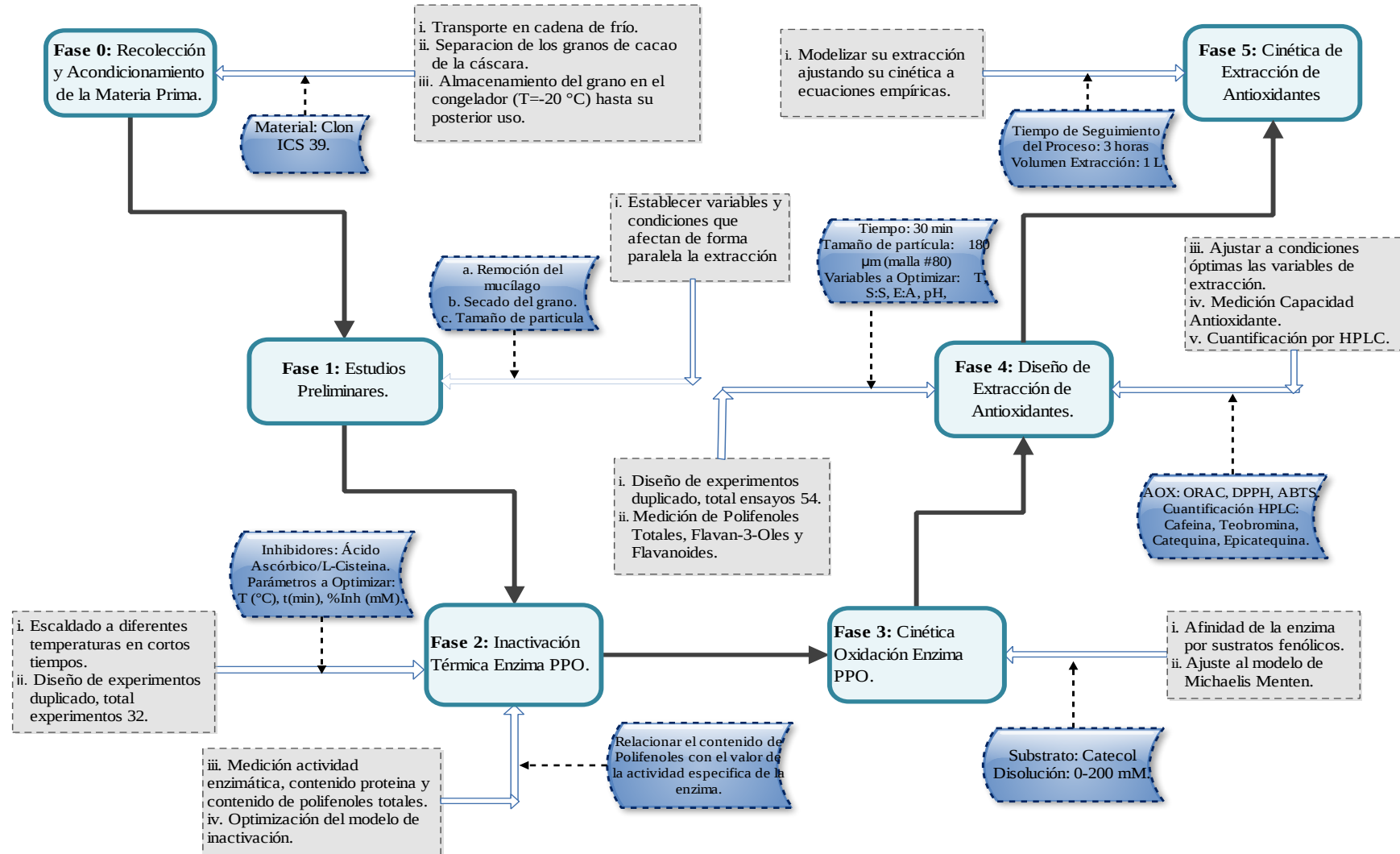
En ambas fases del proyecto, inactivación de la PPO y extracción de PT, se estudió y ajustó los parámetros cinéticos que son base para el diseño, evaluación y optimización de los procesos basados en los efectos de tiempo y temperatura, dando una idea del comportamiento del proceso. Esto permitió obtener los coeficientes que describen el fenómeno al plantear un modelo matemático que se ajuste al proceso. En el caso de los modelos de extracción se ajustó a correlaciones que se asemejan a la cinética de adsorción (Tabla 1) y que describen de manera sencilla el proceso de obtención de polifenoles (Bucić-Kojić, Planinić, Tomas, Bilić, & Velić, 2007) y para la cinética de inactivación de la PPO se implementó el modelo de Michaelis-Menten.

Tabla 1. Modelos Cinéticos para el proceso de extracción. Fuente: (BUCIĆ-Kojić et al., 2007)

Modelo	Ecuación	Parámetros
Peleg	$C(t) = e^{K_1 t^n}$	K_1 , n constantes de Peleg
Peleg Modificado	$C(t) = \frac{t}{K_1 + K_2 t}$	K_1 : Constante de velocidad de extracción K_2 : constante de concentración máxima
Logarítmico	$C(t) = a * \log(t) + b$	a , b : constante del modelo logarítmico
Rakotondramasy	$\ln\left(\frac{C_{eq}}{C_{eq} - C(t)}\right) = K_3 t$	K_3 : constante de velocidad global (min^{-1})

1. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Figura 5. Descripción global de la metodología.



1.1 METODOLOGÍA

Todos los procedimientos y análisis estadísticos que se expondrán a continuación se realizaron por duplicado.

1.2 MATERIALES

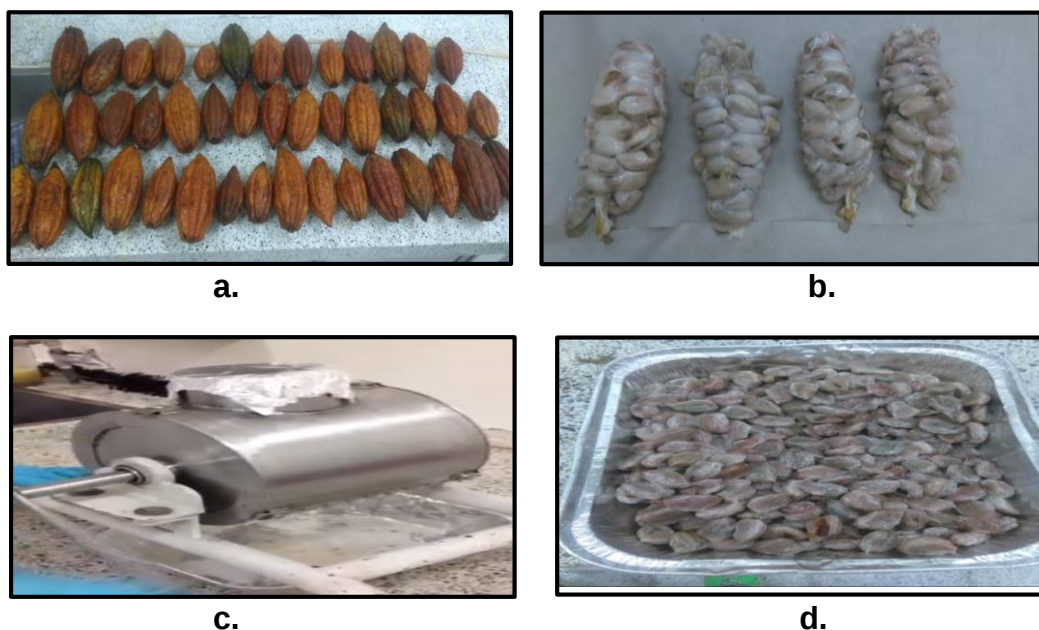
1.2.1 Reactivos: Todos los reactivos empleados en el proyecto fueron de grado analítico y de grado HPLC para uso en el cromatógrafo líquido.

1.2.2 Materiales y Equipos: Balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo), espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Spectronic), baño ultrasónico (ELMASONIC E), centrifuga Megafuge^{16R} (Thermo Scientific), potenciómetro (Schott Geratey), molino de cuchillas (RETSCH), estufa (WTC), tamiz (WS-Tyler), Cromatógrafo líquido acoplado a detector UV-Vis (Thermo Scientific), Espectrofluorímetro AscentTM (Thermo Scientific), Equipo de extracción con control de T, pH, Agitación Bioflow 110 (New Brunswi Scientific).

1.2. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

1.3.1 Fase 0: Recolección y acondicionamiento de la materia prima.

Figura 6. Pasos de acondicionamiento de la materia prima. a) Recolección de Frutos; b) Cotiledones de cacao; c) Desmucilaginado; d) Granos limpios.



Se utilizó grano de cacao perteneciente al clon ICS 39, provenientes de la finca de FEDECACAO, Santa Mónica, ubicada en el municipio de San Vicente de Chucurí- Santander. El fruto se transportó en cadena de frío hasta el laboratorio. Luego, los granos se separaron manualmente de la cacota de la mazorca y se aislaron de la luz y se almacenaron a -20°C, hasta su posterior uso.

1.3.2 Fase 1: Estudios preliminares

Durante esta fase se consideró como criterio de respuesta el contenido de PT con base al procedimiento de extracción reportado por Perea-Villamil (2009), en el cual, 1 g de muestra se desengrasa con hexano empleando ultrasonido por 15min a 25°C (tres extracciones sucesivas de 10 mL). Luego que la muestra se encuentra desengrasada, se procedió a realizar la extracción de PT empleando tres extracciones sucesivas con 20 mL de etanol/agua 80:20 v/v a una temperatura de 60 °C durante 30min. A saber:

Se estudió el efecto del: a) secado de la muestra en horno y por liofilización; b) limpieza del grano de cacao mediante el uso de aserrín, cascarilla de cacao seca y por desmucilagador manual; c) efecto del ultrasonido, tiempo y temperatura del baño; d) tiempo del sistema de reducción de partícula y tamaño de partícula y e) metodología de desengrasado.

1.3.3 Fase 2: Inactivación térmica de la enzima polifenol oxidasa

El tratamiento térmico se llevó a cabo en un baño de agua caliente manteniendo una relación de 1:4 m/v grano (con cascarilla) - solución inhibidora. Una vez terminado el escaldado, inmediatamente las muestras se sumergieron en un baño de agua a 4°C por 30min. Se trabajó con un diseño de experimentos del tipo superficie de respuesta 2³+puntos estrellas + puntos centrales (Tabla 2). El inhibidor consistía en una mezcla 1:1 de ácido ascórbico/L-Cisteína.

Tabla 2. Factores y Niveles para el Diseño de la Fase 2.

Factor	Nivel Bajo	Nivel Alto
T(°C)	70	90
t (min)	1	5
Inhibidor [mM]	0	50

La extracción de la enzima PPO fue acorde al método de (Kim, 1987) con algunas modificaciones, usando como blanco grano sin tratar y se midió la actividad enzimática (AE) ($U_{PPO}/mL \cdot min$) y contenido de proteína para obtener la actividad específica ($U_{PPO}/\mu gBSA$), conjuntamente se propuso correlacionar el contenido de PT de cada uno de los extractos de la inactivación con el valor de la AEs de la PPO.

1.3.4 Fase 3: Cinética de oxidación de la enzima polifenol oxidasa

La cinética de oxidación de la enzima PPO se realizó acorde a la metodología de Chikezie (2015) , usando como sustrato Catecol (0-200mM). El modelo se ajustó al descrito por Lineweaver and Burk (1934) (anexo A) y se determinaron los parámetros de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, los cuales fueron estimados con análisis de regresión lineal y no lineal de la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1):

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} * [s]}{K_m + [s]} \quad (Ecuaci\acute{o}n\ 1)$$

1.3.5 Fase 4: Extracción Sólido-Líquido de Antioxidantes

Con las variables ya maximizadas de la fase preliminar y de inactivación (sección 1.3.2 a 1.3.3), se procedió a plantear un diseño de superficie de respuesta 2^4 +puntos centrales y estrella (Tabla 3). La variable de respuesta fue la medición de a) PT b) FT y c) F3T. Los extractos fueron inmediatamente centrifugados (4000 rpm, 4°C, 15min), filtrados (Whatman N° 1), y almacenados en viales de color ámbar (-20°C). La medición de PT, FT y F3T se realizó en un periodo no mayor a 24h.

Tabla 3. Variables del diseño de superficie de respuesta de extracción de PT.

Factor	Nivel Bajo	Nivel Alto
Temperatura (°C)	40	60
Relación Soluta:Solvente (m/v)	1/60	1/30
Relación Etanol:Agua (v/v)	25:75	75:25
pH	3	5

1.3.6 Fase 5: Cinética de extracción de antioxidantes

Con base en las condiciones favorables de extracción de la sección 1.3.5., se tomaron a diferentes intervalos de tiempo alícuotas (250μL) durante 3h para un

volumen de extracción de 1L. Se midió la concentración de PT, FT y F3T. El ajuste de los parámetros cinéticos de los modelos propuestos en la Tabla 1 se realizó acorde al método de Levenberg-Marquardt empleando el software STATISCA 7.0.

1.3. METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

1.4.1 Medición de la Extracción de la enzima PPO

Después del proceso de inactivación de la sección 1.3.3. el extracto crudo fue inmediatamente extraído acorde a Babu, Rastogi, and Raghavarao (2008). Brevemente, una muestra homogenizada y fría (4°C) se mezcló a una relación de 1:1.5m/v con solución de buffer sodio-fosfato (0,01M, pH 7, 1%PVP) por 15seg usando vortex. Luego el extracto fue filtrado (Whatman N° 1), centrifugado (10000 rpm, 4°C, 20 min) y filtrado nuevamente (PTFE 0,45 µm).

1.4.2 Medición de la Actividad Enzimática (AE) de la enzima PPO

El extracto crudo de la sección 1.4.1. fue empleado en esta fase y la AE fue medida acorde con el procedimiento de Chutintrasri and Noomhorm (2006). El objetivo del ensayo es medir la velocidad inicial de la formación de o-benzoquinona. Una unidad de actividad de la enzima PPO se definió como el cambio en 0,001 (a 420nm/min) por un 1,0 mL del extracto ($U_{PPO}/mLmin$).

1.4.3 Medición del contenido de Proteína

La cuantificación de la proteína del extracto crudo de PPO (sección 1.4.1) se determinó por el método descrito por Bradford (1976), el cual cuantifica la unión del colorante Azul de Coomasie a una proteína desconocida y se compara con el estándar de diferentes concentraciones (7,812 – 125 µg/mL) de proteína suero de albumina bovina (BSA). Los datos fueron expresados como una unidad de AE por 1,0 µg de BSA para 1,0 mL de extracto ($U_{PPO}/\mu g_{BSA}$).

1.4.4 Medición de Polifenoles Totales (PT)

El contenido PT se evaluó acorde al procedimiento descrito por Wollgast (2005). El contenido de PT se calculó empleando una curva de calibración (1.000 - 15,625 mg/mL) y expresado en mg Equivalentes de Ácido Gálico (mgEAG) por gramo de muestra seca y no desengrasada (g_{ms}).

1.4.5 Medición de Flavonoides Totales (FT)

La medición de la familia de flavonoides totales se realizó acorde a Marinova, Ribarova, and Atanassova (2005). El ensayo se fundamenta en que el catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en metanol, formando una coloración roja y con absorbancia a 510nm. El contenido de FT se calculó empleando una curva de calibración y expresando en mg Equivalentes de Catequina (mgCat) por gramo de muestra seca y no desengrasada (g_{ms}).

1.4.6 Medición de Flavan-3-oles Totales (F3T)

Permite determinar específicamente los monómeros, debido a que ocurren dos complejos en el proceso, el primero es el reactivo de vanilina en medio ácido, lo que hace que la molécula se protone, formando un carbocatión. El carbocatión forma un segundo complejo por la reacción con el anillo del flavonoide en el carbón 6 y 8. El nuevo compuesto intermediario formado se colorea a rojo y la lectura de su absorbancia es una medida de la concentración de catequinas. La medición de F3T se realizó acorde al procedimiento de Nakamura, Tsuji, and Tonogai (2003), empleando una curva de calibración y expresando en mg Equivalentes de Epicatequina (mgCat) por gramo de muestra seca no desengrasada (g_{ms}).

1.4.7 Medición de la Capacidad Antioxidante (CA) por el método ORAC

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno se midió por la degradación oxidativa de una molécula fluorescente (fluoresceína) implementado el método propuesto por HUANG (2002). Cada concentración evaluada se analizó por triplicado. Los resultados se expresaron en μmol Equivalente Trolox por gramo material liofilizado ($\mu\text{molET/g}_{\text{lío}}$).

1.4.8 Determinación de la capacidad antiradicalaria por DPPH

Procedimiento acorde con Du & Li (2012). La curva de calibración se construyó con un estándar de Trolox de 62,5-1000 μM . Los datos fueron expresados en IC₅₀ acorde a la ecuación 2:

$$\text{Capacidad antiradicalaria (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}}\right) * 100 \text{ (Ecuación 2)}$$

1.4.9 Medición de la capacidad antiradicalaria por el método de ABTS

Procedimiento según Belščak, et al., (2009). La curva de calibración se construyó con un estándar de Trolox de 100-1000µM. Los datos se expresaron en IC50 (Ecuación 2)

1.4.10 Identificación y cuantificación de metilxantinas y flavanoides por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

El análisis por HPLC se realizó por triplicado únicamente al extracto rico en AOX obtenido al final de la fase de la metodología de experimentación. La determinación de metilxantinas y flavonoides se hizo acorde al método validado del Laboratorio Alimentos CICTA, empleando una columna C18 (Zorbax Eclipse XDB, 150mm*2.1 mm, 5µm) y como solventes agua acidificada (0,5% ácido acético) y metanol. La identificación de los metabolitos se llevó comparando sus tiempos de retención con las sustancias de referencia certificadas. La cuantificación se realizó a 280nm por el método de estándar externo usando curvas de calibración de las sustancias patrón: teobromina, cafeína, (-)-epicatequina, (+)-catequina con concentraciones entre 0,625-50 ppm.

1.5 METODOLOGÍA DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

1.5.1 Validación de Parámetros

La linealidad se ensayó por medio de la curva de calibración del estándar, determinada por medio de una regresión lineal (parámetro R^2) de la curva de respuesta del analito versus la concentración del mismo.

1.5.2 Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados con el software estadístico STATISTICA 7.0. Los descriptores estadísticos (media y desviación estándar) fueron implementados para las representaciones gráficas de tres experimentos independientes. En el caso de las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamientos para todas las variables fueron evaluadas con ANOVA ($p < 0,05$) y las diferencias específicas fueron identificadas usando el test de Tuckey. Los diseños estadísticos para la optimización de factores operacionales fueron ejecutados por duplicado, considerando puntos centrales y estrellas, analizados por ANOVA y de hipótesis nula (varianza constante).

2. RESULTADOS

2.1 FASE 1: ESCOGENCIA DE PARÁMETROS PRELIMINARES

2.1.1 Limpieza del grano

Se evaluó la limpieza del grano de cacao mediante el uso de aserrín, cascarilla de cacao seca y haciendo uso de un desmucilagador operado manualmente, este último método fue el que se implementó debido a que tanto el aserrín como la cascarilla interferían negativamente el ensayo de PT, encontrándose 9,71 y 30,16 mgEAG/g respectivamente, valores que son inferiores en un 65% al valor promedio de granos verdes sin fermentar.

2.1.2 Tipo de Secado y tiempo

Se escogió el secado en horno con recirculación a 70°C durante 3h, ya que no se encontró diferencia significativa en la concentración de PT (Tabla 4). Aunque los polifenoles son termosensibles el corto tiempo de secado no afectó significativamente la concentración de PT. Según Ikeda et al. (2003) este comportamiento se presenta porque a 70°C ocurre la epimerización de (±)-catequinas a (±)-catequina-galato, lo cual hace que el extracto presente mayor poder antioxidante. Resultados similares fueron encontrados por Hii, Law, Cloke & Suzannah (2009), quienes evaluaron diferentes cinéticas de secado en horno (60-80°C), ambiente y por liofilización, concluyendo que a 70°C el extracto conserva la mayor parte de sus polifenoles cuando se compara con la técnica de liofilización.

Tabla 4. Efecto del tipo y tiempo de secado sobre PT.

Tipo de Secado	Tiempo de Secado*	Polifenoles Totales (mgEAG/g _{ms})
Horno 50°C	20h	39,999 ± 0,431 ^a
Horno 70°C	3h	42,736 ± 0,499 ^a
Liofilización	48h	44,096 ± 0,231 ^a

*El tiempo de secado corresponde hasta alcanzar peso constante. Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza de $p \leq 0,05$.

2.1.3 Efecto del ultrasonido, tamaño de partícula y desengrasado sobre la concentración de PT

El grupo CICTA ha validado el desengrasado de grano de cacao empleando como técnica ultrasonido y solvente n-hexano (Perea-Villamil, 2009) . Generalmente, en este proceso se usa disolventes tóxicos que pueden dejar trazas en el material. De esta manera, se evaluó diferentes tamaños de partícula, uso del ultrasonido a diferentes tiempos y temperatura como metodología para evitar el proceso del desengrasado. La Tabla 5 y 6 resume los resultados obtenidos en esta fase.

Tabla 5. Efecto del desengrasado, tamaño de partícula sobre la concentración de PT

Tratamiento	Polifenoles Totales (mgEAG/g _{ms})
Desengrasada (D) (T _{part} >420 µm)	42,122 ± 2,512 ^b
No Desengrasada (ND) (T _{part} > 420 µm)	24,890 ± 1,899 ^b
ND (T _{part} .: 420-180µm)	42,752 ± 1,274 ^b
D (T _{Part} .: 420-180µm)	48,373 ± 0,676 ^a
ND (T _{Part} .: <180µm)	50,028 ± 0,104 ^a

Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido T.Part: Tamaño de partícula. Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza de p≤ 0,05.

Tabla 6. Efecto del ultrasonido sobre la concentración de polifenoles totales.

Tratamiento	Polifenoles Totales (mgEAG/g _{ms})
Extracción sólido-líquido asistida con ultrasonido	52,2101 ± 0,904 ^a
Extracción sólido-líquido	42,4485 ± 2,192 ^b

*Muestras No Desengrasadas. Tamaño de partícula<180µm. Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza de p≤ 0,05.

Con base en lo anterior, se puede establecer que el tamaño de partícula juega un rol importante en la liberación de compuestos bioactivos, donde aparentemente es necesario desengrasar, sin embargo, la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido a un tamaño de partícula <180µm, evita el proceso de desengrasado. Además, se estudió que con solo 15min de

ultrasonido a 4°C y molienda en frío (-10°C, 2min) (Anexo B) se alcanza equilibrio de extracción de PT. El efecto del ultrasonido como tecnología para evitar el desengrasado se debe al rompimiento de las paredes celulares causado por la cavitación ultrasónica, resultando en la liberación de las sustancias polifenólicas (Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010) . El ultrasonido también ofrece un efecto mecánico que permite una mayor penetración del disolvente en la matriz vegetal aumentando el área de superficie de contacto entre las fases sólida y líquida (Luque-García & De Castro, 2003) .

Un comportamiento similar fue encontrado para la extracción de compuestos polifenólicos con ultrasonido de residuos de aserrín. Se mostró un aumento de más del 30% en comparación con la maceración convencional (Meullemiestre, Petitcolas, Maache-Rezzoug, Chemat, & Rezzoug, 2016) y del 10,9% para la cáscara de naranja (Khan et al., 2010) .

2.2 FASE 2: DISEÑO DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA PPO

La actividad enzimática (AE) de la enzima se relacionó con la concentración de proteína debido a que todas las enzimas son proteínas pero no todas las proteínas son enzimas, determinando así el valor de la actividad específica de la enzima en cada tratamiento. Debido a que no se encontró una relación directa entre una alta concentración de PT y una alta inhibición (Anexo C) –que consistía en el objetivo de esta fase se propuso el modelo matemático de la ecuación 2:

$$\omega = \frac{\%Polifenoles}{100 - \%Inactivación} \rightarrow (\text{Ecuación 2})$$

Con base en los datos de AE y de PT (Anexo D) y empleando la ecuación 2, se observa que a mayores % de inactivación hay una mayor concentración de polifenoles (Fig. 7 y 8). Ingresando estos datos en el paquete estadístico, se encuentra como condiciones favorables de inactivación: una concentración de 70mM de solución inhibitoria (1:1 ácido ascórbico:L-cisteína) a 96°C durante 6,36min, para un R² de 0,8819 y un teórico de $\omega = 11,8706$. A estas condiciones se encuentra experimentalmente un %inactivación de 91,32% para un contenido de PT de 94,705 mgEAG/g_{ms}, equivalente a un ω experimental 11,648, lo cual

significa que el modelo estadístico predice en un 98% de confianza el proceso de inactivación de la PPO.

Figura 7. a) Relación entre la concentración de PT y la variable ω . b) Correlación del %Inactivado y la variable ω .

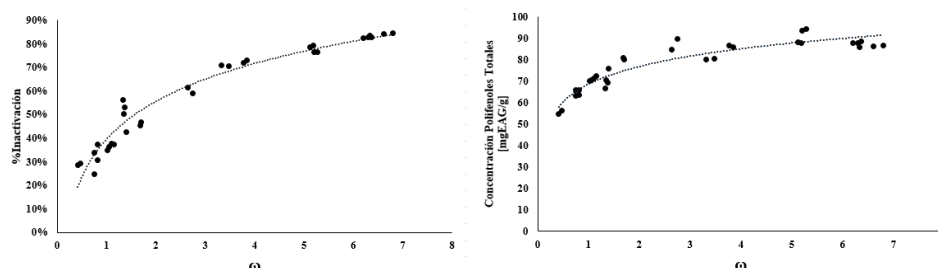
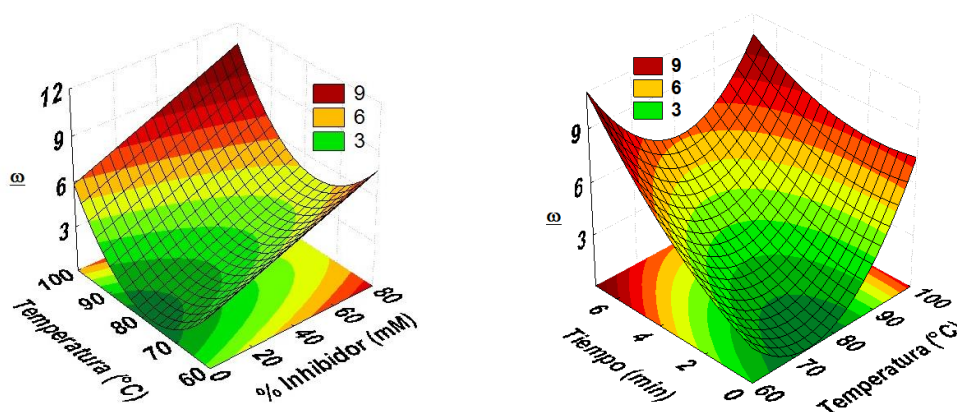


Figura 8: Gráfica de Superficie de Respuesta del proceso de Inhibición de la PPO. a) ω Vs t (min) y T ($^{\circ}\text{C}$) [%inh=26,25 mM]; b) ω Vs T (min) y %inh (mM) [$t=3,05$ min].



2.3 FASE 3: PARÁMETROS CINÉTICOS DE OXIDACIÓN ENZIMA PPO

Con el valor óptimo del diseño de inactivación, se procedió a determinar la cinética enzimática, usando como sustrato catecol a concentraciones de 0,1-200mM. La gráfica de la velocidad de reacción de oxidación de la enzima PPO es hiperbólica en la primera parte de la curva lo que sugiere la cinética de Michaelis-Menten (Fig. 9), en la segunda parte la actividad catecolasa decrece indicando que el extracto enzimático presenta la capacidad de oxidar este tipo de sustratos (Aniszewski, Lieberei, & Gulewicz, 2008) y tiene una gran afinidad por los compuestos fenólicos. El estudio reveló que el inhibidor afecta la $V_{\text{máx}}$ de oxidación, siendo 20 veces menor la velocidad de oxidación del catecol en presencia del tratamiento térmico. La Tabla 7 muestra los datos obtenidos para

las constantes cinéticas de la enzima PPO extraída de los granos de cacao sin fermentar.

Figura 9. Cinética enzimática de la enzima PPO.

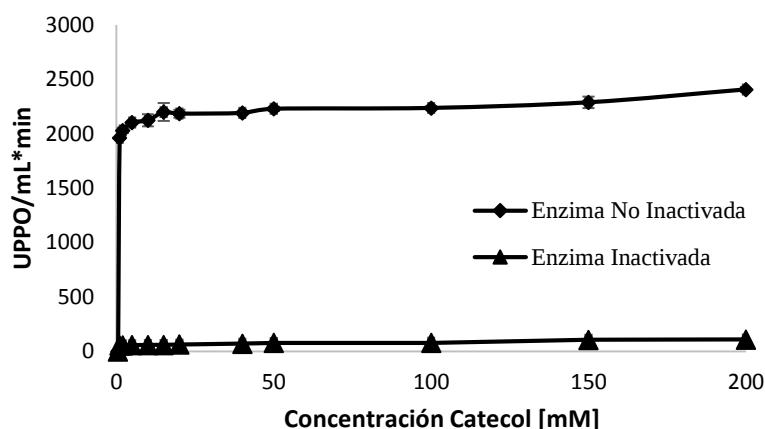


Tabla 7. Parámetros de oxidación de la enzima PPO para cacao.

Sustrato	K_m [mM]	$V_{m\acute{a}x}$ [UPPO/mLmin]	Especificidad del sustrato ($V_{m\acute{a}x}/K_m$)
Catecol ^a	$3.749 \pm 0,44^a$	$2.500 \pm 23,00$	667
(-)-Epicatequina ^b	$1.282 \pm 0,37^b$	91.531 ± 1.249	71.797
(+)-Catequina ^b	$2.522 \pm 0,66^b$	72.707 ± 6.147	28.829

Fuente: a) Autor y b) (QUINTERO, 2012). Letras diferentes expresan diferencias significativas con nivel de confianza de $p \leq 0,05$.

Los valores para K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se hallaron por medio de la gráfica del doble recíproco (Anexo A). Los resultados obtenidos por Quintero (2012) para la enzima PPO muestran que la enzima presenta una mayor reactividad frente a la (-)-epicatequina y en segundo lugar con la (+)-catequina, lo cual está sustentado en una menor K_m y una mayor $V_{m\acute{a}x}$. Con el objeto de evaluar la especificidad de sustrato, la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ fue tomada como criterio donde los sustratos (-)-epicatequina y (+)-catequina (metabolitos de interés) tienen alta afinidad con la enzima, mientras que el catecol tiene menos afinidad con el sitio de unión de la enzima, resultados similares a los de Kumar, Mohan, & Murugan (2008) para la PPO presente en la cereza.

2.4 FASE 4: ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE INFLUYEN EN EL SISTEMA DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO.

Las condiciones favorables de extracción de los compuestos polifenólicos se realizaron maximizando simultáneamente el rendimiento en PT, F3T, y FT por medio de la metodología de superficie de respuesta. El estadístico R^2 indicó que el modelo explica el 95,668%, 95,412%, 90,549% de la variabilidad del contenido de PT, F3T, y FT respectivamente. Los niveles de los factores experimentales estudiados que maximizan la recuperación de polifenoles son: 70°C, 50 (v/v) relación Etanol:Agua, 1:120 (m/v) relación Soluta/Solvente y pH de 6,0. El software estadístico predice que a estas condiciones se recuperan $117,870 \pm 16,683$ mgEAG/g_{ms} de PT; $70,856 \pm 15,982$ mgCat/g_{ms} de FT y $85,2149 \pm 18,508$ mgCat/g_{ms} de F3T

Para estas condiciones se logró extraer experimentalmente 112,37 mgEAG/g_{ms} de PT, 59,78 mgCat/g_{ms} de FT y 73,56 mgCat/g_{ms} de F3T presentes en el grano de cacao. Estas variables optimizadas presentan un comportamiento similar a las de los procesos de extracción de polifenoles por otros autores (Tabla 8).

Tabla 8. Variables de extracción optimizadas para la extracción de polifenoles.

Fuente Vegetal	T (°C)	Relación Etanol:Agua (v/v)	Relación Soluta:Solvente (m/v)	pH
<i>Almendra de Mango</i> (Toro U & Rosso C, 2011)	67	57/43	1/5	5,6
<i>Semilla de Uva</i> (Shi et al., 2003)	65	50/50	-	-
<i>Cáscara de Cacao</i> (Toledo y Correa, 2014)	60	50/50	1/120	6,0
<i>Clon ICS 39</i>	70	50/50	1/120	6,0

2.4.1 Efecto de las variables del proceso sobre la extracción de polifenoles Ver figuras 10-12.

2.4.1.1 Efecto de la Temperatura: temperaturas altas favorecen la liberación de PT al disminuir la firmeza al tejido vegetal (Shi et al., 2003) .

- 2.4.1.2 Efecto de la relación Etanol:Agua:** Cambios en la polaridad del solvente permite una mayor recuperación de compuestos polifenólicos al hacerlos más solubles en etanol que en agua (Zhao & Hall, 2008) .
- 2.4.1.3 Efecto del pH:** Medios levemente acidificados (pH 4-6) mejoran la solubilidad de la molécula en el disolvente ya que podrían facilitar la accesibilidad a la compleja estructura celular (Spigno & De Faveri, 2007) . Por ejemplo, Sheabar & Neeman (1988) reportaron para el orujo de oliva un máximo de solubilidad a pH 4 y Lehtinen & Laakso (1998) en la extracción de antioxidantes de la fibra de avena a un pH de 6.
- 2.4.1.4 Efecto de la relación Soluta:Solvente:** Altas relaciones de solvente-soluta incrementan la solubilidad del extracto vegetal, al existir un contacto más específico entre las fases (Juntachote, Berghofer, Siebenhandl, & Bauer, 2006) .

Figura 10. Gráficos de superficie de respuesta para PT. A) PT vs S:S y T (E:A=50%; pH=4); b) PT vs E:A, T (S:S= 0,025; pH=4)

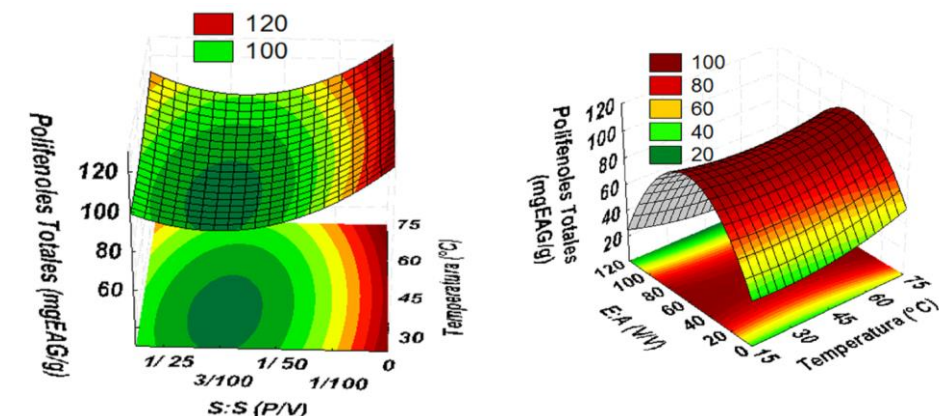


Figura 11. Gráficos de superficies de respuesta para FT. a) FT vs S:S y T (E:A=50%; pH=4);
b) FT vs E:A y S:S (T=50; pH=4)

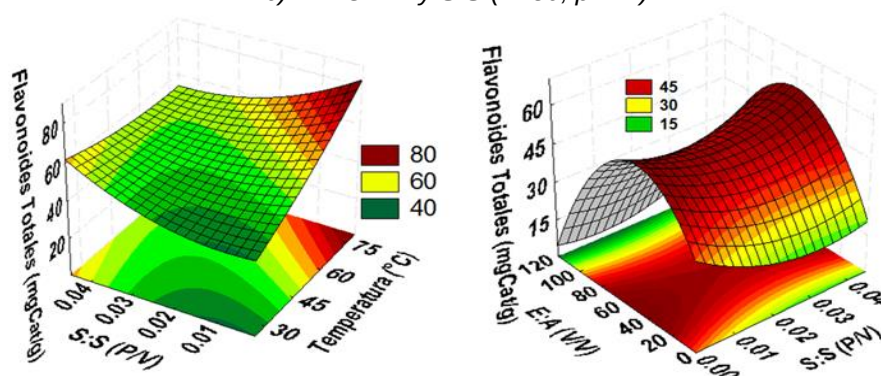
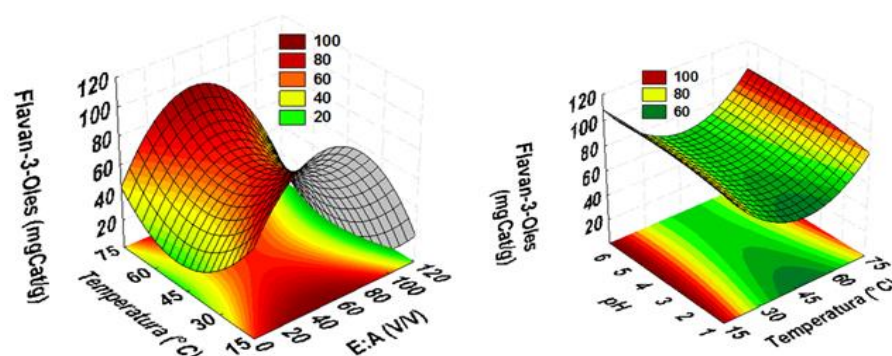


Figura 12. Gráficos de superficies de respuesta para F3T. a) F3O vs T, EA; (S:S=0,25; pH=4);
b. F3O vs pH y T (S:S=0,25; E:A=50%)



2.4.2 Cuantificación de flavonoides y metilxantinas por HPLC, capacidad antioxidante por el método de ORAC y antiradical por DPPH y ABTS.

La implementación del HPLC permitió estudiar el efecto de las diferentes fases del proceso sobre la concentración total de las metilxantinas (teobromina y cafeína) y monómeros de catequina. Para la muestra original (sin tratar) se tiene un contenido total de 24,17 mgMetilxantinas/g_{ms} y de 20,4 mgFlavan-3-oles/g_{ms}. La implementación del pretratamiento con ultrasonido, permite aumentar un 5,88% y 16,34% la concentración de monómeros de catequina y metilxantinas respectivamente. A partir de las condiciones favorables de inhibición de la PPO el contenido de flavan-3-oles aumenta en un 46,1% y para las mejores condiciones de extracción se encuentra un total de 60,3 mgFlavan-3-oles/g_{ms} y de 27,82 mgMetilxantinas/g_{ms}.

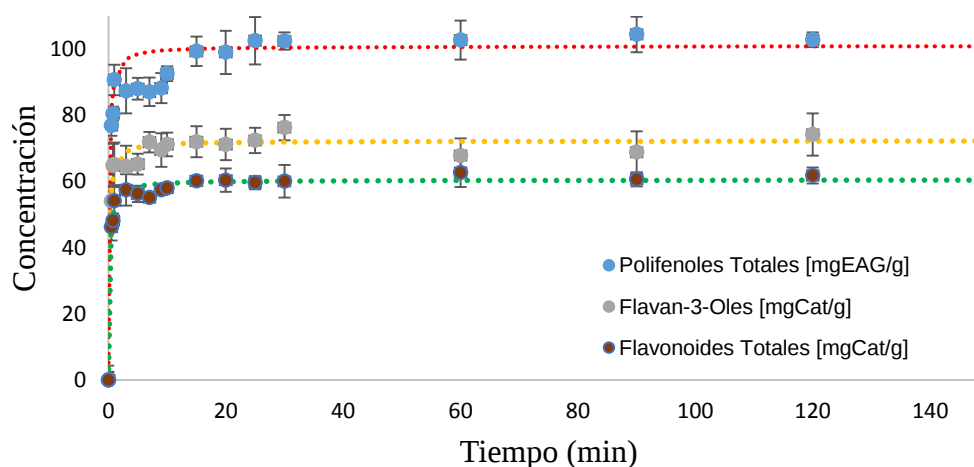
Con base en el extracto liofilizado (color violeta, característicos de los polifenoles), se encuentra por HPLC un contenido de 177 mgFlavan-3-oles/g_{ms} y de 184,3 mgMetilxantinas/g_{ms}. El contenido de flavonoides es 2,11 veces mayor que el reportado por Schinella et al. (2010) y 2,74 veces mayor que el de Sierra L (2013) , y en el caso de metilxantinas es aproximadamente 11 veces mayor que el reportado por Schinella et al. (2010).

Para verificar la eficacia del extracto polifenólico liofilizado de prevenir la generación de especies reactivas de oxígeno, se evaluó su capacidad antioxidante (CA) por ORAC y antiradical por DPPH y ABTS, ya que los efectos antioxidantes y su mecanismo no pueden ser totalmente caracterizados con un único método. Se encontró una CA por ORAC de $7.146,150 \pm 205,73 \mu\text{molET/g}_{\text{lio}}$ superior en 1,6 veces a la del ácido gálico, y aproximadamente el doble que la CA del Té verde, y un aumento del poder antioxidante del 16% para el mismo clon reportado por Sierra L (2013) . Por su parte, para una concentración de 1.000 ppm, el extracto tiene un IC₅₀ por DPPH de 87,95, lo que indica que supera el clon de cacao CCN-51 en un 58,5% pero con una etapa adicional de purificación el CCN 51 supera al ICS 39 en un 34,89% (Schinella et al., 2010). En el caso de ABTS el IC₅₀ es de 53,59 lo que lo hace 12 veces superior al chocolate de mesa (Perea-Villamil, 2009) .

2.5 FASE 5: MODELAMIENTO CINÉTICO DE LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos para las extracciones realizadas con el seguimiento en la variación de la concentración de los metabolitos de interés a través del tiempo.

Figura 13. Cinéticas de extracción de antioxidantes del grano de cacao.



Se observa experimentalmente que la extracción muestra similitud con los procesos de adsorción que pueden ser bien descritos por los modelos de la Tabla 1, pero el modelo de Peleg-Modificado, muestra el coeficiente de correlación más alto en todos los experimentos ($R^2 > 99,8\%$) lo que implica una buena concordancia entre los datos experimentales y teóricos. Resultados que logran ser descritos también por el modelo de Peleg Modificado son los reportados por Toro U and Rosso C (2011) con la extracción de polifenoles de la almendra de mago, Toledo & Correa (2014) extracción de polifenoles a partir de la cáscara de cacao, semilla de uva (Bucić-Kojić et al., 2007) y a partir de la soya (Jokić et al., 2010) .

Tabla 9. Parámetros que describen la cinética de extracción de PT.

Peleg Modificado	Extracción de PT	Extracción de F3T	Extracción de FT
K_1	0,0012	0,0020	0,0028
K_2	0,0099	0,0138	0,0165
R^2	0,97	0,98	0,98

Las constantes del modelo de Peleg-Modificado tienen un significado físico, K_1 es el inverso de la velocidad de extracción ($\text{min/mgEAG} \cdot \text{g}^{-1}$) que al compararlo con resultados de otros autores se evidencian que el proceso de extracción de polifenoles de la semilla de cacao es un proceso rápido, siendo 29 veces más

rápido que para la almendra de mango (Toro U & Rosso C, 2011) y para la cáscara de cacao el proceso es 2 veces más rápido (Toledo & Correa, 2014), 33 y 500 veces más rápido para los procesos de extracción de la uva y la soya respectivamente (Bucić-Kojić et al., 2007; Jokić et al., 2010).

Mientras que la constante K_2 es el inverso de la concentración máxima (g/mgEAG) cuando el tiempo tiende a infinito, que para el caso del grano de cacao solo fue superado con el proceso de extracción de polifenoles del mango 142,85 contra 101,01 mgEAG/g_{ms} de la semilla de cacao.

Derivando la ecuación de Peleg-Modificado ecuación (3) se puede determinar teóricamente el tiempo de equilibrio de extracción de antioxidantes con un error del 5%. Entonces, se alcanza el equilibrio de extracción a ~45min para PT, ~38min para F3T y ~35min para FT. Estos son 2 veces más rápidos que el de extracción a partir de la almendra de mango (Toro U & Rosso C, 2011).

$$\frac{dC}{dt} = \frac{K_2}{(K_1 + K_2)^2} \rightarrow (\text{Ecuación 3})$$

3. CONCLUSIONES

- ❖ El diseño de inactivación de la PPO permitió obtener un modelo que predice cuantitativamente la actividad específica de la enzima polifenol oxidasa y el contenido de sustancias polifenólicas presentes en el grano de cacao, que a lo mejor de nuestro conocimiento no se han reportado investigaciones similares en el cacao, incursionando en esta temática con un aporte significativo. Asimismo, la inhibición de la enzima PPO contribuye a una mayor recuperación de monómeros, en específico, la (-)-epicatequina.
- ❖ Se establecieron las condiciones operacionales de la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido (pre-tratamiento ultrasónico por 15min, temperatura de 70°C, relación etanol agua 50%, relación soluto solvente 1:120 S/S y pH de 6.0) para obtener una concentración de polifenoles de 112,35 mgEAG/g_{ms} y que simultáneamente contienen un alto contenido de flavonoides monoméricos.
- ❖ Con la metodología implementada se obtuvieron extractos con una actividad antioxidante de $7.146,150 \pm 205,73 \mu\text{molET/g}_{\text{ms}}$ y antiradical con un IC₅₀ de 53,59 para ABTS y 87,95 para DPPH. Esto significa que el extracto tiene amplias aplicaciones en productos alimenticios o farmacéuticos.
- ❖ La ecuación de Peleg-Modificada demostró ser adecuada para modelar la cinética de extracción sólido-líquido de polifenoles totales de grano de cacao que fue probado por una alto coeficiente de correlación en todos los experimentos $R^2 > 0,9896$, el 90% de los compuestos de interés alcanzan un tiempo de equilibrio en 40 minutos, estos resultados podrían ser empleados en investigaciones posteriores para hacer escalable el proceso a nivel industrial.
- ❖ Se logró potencializar la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos extraídos, en comparación con los trabajos anteriores de la misma línea de cacao, desarrollados por el laboratorio de alimentos CICTA, evidenciando un aporte en lo realizado en este trabajo de pregrado.

BIBLIOGRAFÍA

- ANISZEWSKI, T., LIEBEREI, R., & GULEWICZ, K. (2008). Research on catecholases, laccases and cresolases in plants. Recent progress and future needs. *Acta Biol Cracov Bot*, 50, 7-18.
- BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., & SAMMAN, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- BELŠČAK, A., KOMES, D., HORŽIĆ, D., GANIĆ, K. K., & KARLOVIĆ, D. (2009). Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International*, 42(5), 707-716.
- BRADBURY, A. G. W., & BERNDT, E.-M. (2011). Cocoa beans with reduced polyphenol oxidase activity and high polyphenol content: Google Patents.
- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1), 248-254.
- BUCIĆ-Kojić, A., PLANINIĆ, M., TOMAS, S., BILIĆ, M., & VELIĆ, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236-242.
- Carnésecchi, S., Schneider, Y., Lazarus, S. A., Coehlo, D., Gossé, F., & Raul, F. (2002). Flavanols and procyanidins of cocoa and chocolate inhibit growth and polyamine biosynthesis of human colonic cancer cells. *Cancer letters*, 175(2), 147-155.
- CARRILLO & et al, L. C. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in Theobroma cacao beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273-280.
- CHIKEZIE, P. C. (2015). Kinetic Studies of Polyphenol Oxidase from White Yam (*Dioscorea rotundata* Poir) Tuber. *J Nutr Food Sci*, 5(355), 2.
- CHUTINTRASRI, B., & NOOMHORM, A. (2006). Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *LWT-Food Science and Technology*, 39(5), 492-495.
- FABIANI, G., PÉREZ, E., CORRAL, L., SALGUERO, A., RODRIGO, J., & BOGGETTI, H. (2012). INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIRRADICALARIA DE VEGETALES RICOS EN ANTOCIANINAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS.
- GUPTA, A., KAGLIWAL, L. D., & SINGHAL, R. S. (2013). Biotransformation of polyphenols for improved bioavailability and processing stability. *Adv. Food Nutr. Res*, 69, 183-217.
- HARBORNE, J. B., & BAXTER, H. (1999). *The handbook of natural flavonoids. Volume 1 and Volume 2*: John Wiley & Sons.
- HENDRICKX, M., LUDI KHUYZE, L., VAN DEN BROECK, I., & WEEMAES, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 197-203.
- HUANG, D. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437-4444.
- IEMMA, J., ALCARDE, A. R., DOMARCO, R. E., SPOTO, M. H. F., BLUMER, L., & MATRAIA, C. (1999). Radiação gama na conservação do suco natural de laranja. *Scientia Agricola*, 56(4), 1193-1198.
- Ikedo, I., Kobayashi, M., Hamada, T., Tsuda, K., Goto, H., Imaizumi, K., . . . Kakuda, T. (2003). Heat-epimerized tea catechins rich in gallocatechin gallate and catechin gallate are more effective to inhibit cholesterol absorption than tea catechins rich in epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(25), 7303-7307.

- İYİDOĞAN, N., & BAYINIIRLI, A. (2004). Effect of L-cysteine, kojic acid and 4-hexylresorcinol combination on inhibition of enzymatic browning in Amasya apple juice. *Journal of Food Engineering*, 62(3), 299-304.
- JAIMES, E., & PICO, H. (2014). *Estudio Preliminar de la Influencia de los Principales Parámetros de Extracción Usado Dióxido de Carbono Supercrítico y Etanol*. (Ingeniero Químico), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- JOKIĆ, S., VELIĆ, D., BILIĆ, M., BUCIĆ-Kojić, A., PLANINIĆ, M., & TOMAS, S. (2010). Modelling of the process of solid-liquid extraction of total polyphenols from soybeans. *Czech journal of food sciences*, 28(3), 206-212.
- JUNTACHOTE, T., BERGHOFER, E., SIEBENHANDL, S., & BAUER, F. (2006). The antioxidative properties of Holy basil and Galangal in cooked ground pork. *Meat science*, 72(3), 446-456.
- KADOW, D., NIEMENAK, N., ROHN, S., & LIEBEREI, R. (2015). Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.)—Reconstruction and guidance of the fermentation process. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 357-361.
- KHAN, M. K., ABERT-Vian, M., FABIANO-Tixier, A.-S., DANGLES, O., & CHEMAT, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food chemistry*, 119(2), 851-858.
- KIM, H. (1987). *Isolation and characterization of polyphenol oxidase from cocoa beans*.
- KUMAR, V. A., MOHAN, T. K., & MURUGAN, K. (2008). Purification and kinetic characterization of polyphenol oxidase from Barbados cherry (*Malpighia glabra* L.). *Food chemistry*, 110(2), 328-333.
- LEHTINEN, P., & LAAKSO, S. (1998). Effect of extraction conditions on the recovery and potency of antioxidants in oat fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4842-4845.
- LINEWEAVER, H., & BURK, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658-666.
- LUQUE-Garcia, J., & DE CASTRO, M. L. (2003). Ultrasound: a powerful tool for leaching. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(1), 41-47.
- MARSHALL, M. R., KIM, J., & WEI, C. (2000). Enzymatic browning in fruits, vegetables and sea foods.
- Martin, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2013). Potential for preventive effects of cocoa and cocoa polyphenols in cancer. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 336-351.
- MEULLEMIESTRE, A., PETITCOLAS, E., MAACHE-Rezzoug, Z., CHEMAT, F., & REZZOUG, S. (2016). Impact of ultrasound on solid-liquid extraction of phenolic compounds from maritime pine sawdust waste. Kinetics, optimization and large scale experiments. *Ultrasonics sonochemistry*, 28, 230-239.
- ÖZOĞLU, H., & BAYINDIRLI, A. (2002). Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control*, 13(4), 213-221.
- PEREA-Villamil, J. A. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Salud UIS*, 41, 128-134.
- PÉREZ-Jiménez, J., NEVEU, V., VOS, F., & SCALBERT, A. (2010). Identification of the 100 richest dietary sources of polyphenols: an application of the Phenol-Explorer database. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, S112-S120.
- PÉREZ, E., ÁLVAREZ, C., & LARES, M. (2002). Caracterización Física y Química de Granos de Cacao Fermentados, Secos y Tostados de la Región del Chuao. *Agronomía Tropical*, 52(2), 161-172.
- QUINTERO, G. (2012). *Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización*. Maestría en Ciencias Farmaceuticas.

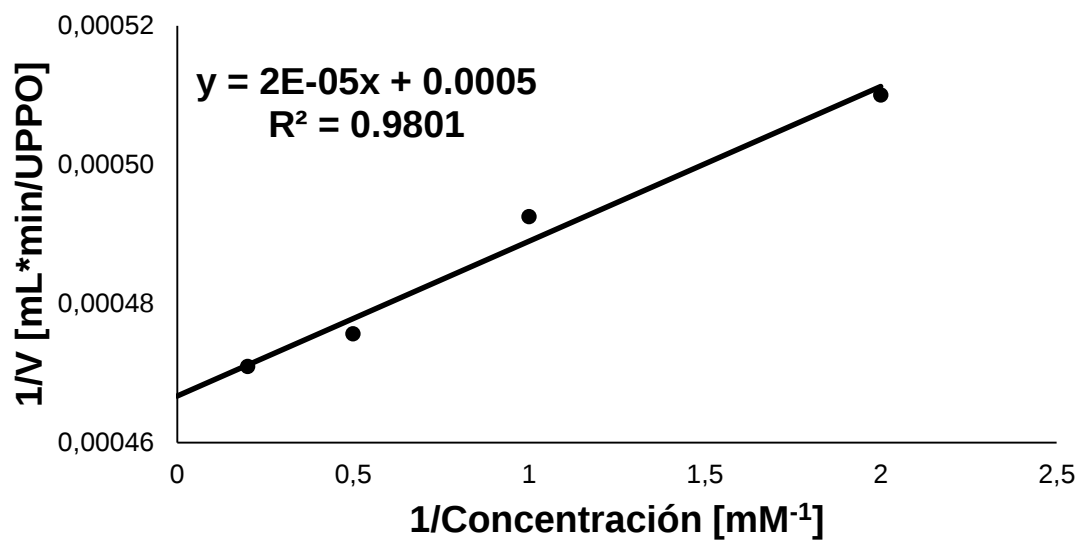
- RANDHIR, R., LIN, Y.-T., & SHETTY, K. (2004). Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 13(3), 295-307.
- RAPEANU, G., VAN Loey, A., SMOUT, C., & HENDRICKX, M. (2005). Thermal and high-pressure inactivation kinetics of polyphenol oxidase in Victoria grape must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 2988-2994.
- RAPEANU, G., VAN Loey, A., SMOUT, C., & HENDRICKX, M. (2006). Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*). *Food chemistry*, 94(2), 253-261.
- SCHINELLA, G., MOSCA, S., CIENFUEGOS-Jovellanos, E., PASAMAR, M. Á., MUGUERZA, B., RAMÓN, D., & RÍOS, J. L. (2010). Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*, 43(6), 1614-1623.
- SHEABAR, F. Z., & NEEMAN, I. (1988). Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(6), 990-993.
- SHI, J., YU, J., POHORLY, J., YOUNG, J. C., BRYAN, M., & WU, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *J. Food Agric. Environ*, 1(2).
- SIERRA L, P. J. (2013). *Evaluación de la capacidad antioxidante, contenido de polifenoles y metilxantinas en materiales de cacao colombianos*. (Químico), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- SPIGNO, G., & DE FAVERI, D. M. (2007). Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 793-801.
- Toledo, C., & Correa, R. (2014). *Determinación y Ajuste de Parámetros Cinéticos de la Extracción de Polifenoles Totales a Partir de la Cascara de Cacao*. (Ingeniero Químico), Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga.
- TOMÁS - Barberán, F. A., & ESPIN, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853-876.
- TORO U, S., & ROSSO C, A. M. (2011). *OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO DE POLIFENOLES A PARTIR DE LA ALMENDRA DE MANGO HILACHA (Mangifera indica. Var. Magdalena River) Y AJUSTE DE SUS PARÁMETROS CINÉTICOS*. (Ingeniero Químico), UIS, Bucaramanga.
- TSAO, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.
- VERMERRIS, W., & NICHOLSON, R. (2007). *Phenolic compound biochemistry*: Springer Science & Business Media.
- WOLLGAST, J., & ANKLAM, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447.
- ZHAO, B., & HALL, C. A. (2008). Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. *Food chemistry*, 108(2), 511-518.
- ZUMBÉ, A. (1998). Polyphenols in cocoa: are there health benefits? *Nutrition Bulletin*, 23(1), 94-102.

ANEXOS

ANEXO A. GRÁFICO DEL DOBLE RECÍPROCO

$$v = \frac{v_{m\acute{a}x} * [S]}{K_m + [S]} \quad ; \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{v_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{v_{m\acute{a}x}} \frac{1}{[S]}$$

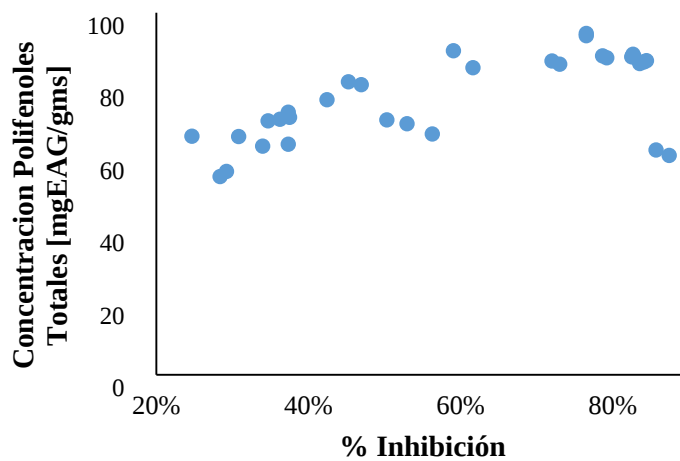
Gráfica Lineweaver-Burk



ANEXO B. ANÁLISIS PRELIMINARES PREVIOS A LOS DISEÑOS DE INACTIVACIÓN Y EXTRACCIÓN

		CRITERIO	RESPUESTA	CONCLUSIÓN
PROCEDIMIENTO	Remover el Mucílago	¿El aserrín afecta la medida de PT?	9,7092 mgEAG/g	Implementar otro método de des-muciligenado
		¿Hay trazas de aserrín en la muestra?	SI	
	Secado de la semilla	Abierta	41,0806 mgEAG/g	Abrir el grano para eliminar la humedad
		Cerrada	39,60225 mgEAG/g	
	Tipo de secado	Horno	41,6805 mgEAG/g	Secar el grano en horno: menor tiempo y mas asequible
		Liofilizador	43,3425 mgEAG/g	
	Tratamiento de Ultrasonido	Sonicación de la muestra	52,21 mgEAG/g	Aplicar un pretratamiento con ultrasonido para favocer la liberación de los polifenoles
		Maceracion convencional	42,45 mgEAG/g	
	Periodo del Ultrasonido	15min	16,03 mgEAG/g	Tratar por 15 min la muestra
		30min	17,70 mgEAG/g	
		45min	16,2362 mgEAG/g	
	Efecto del Tamaño de Partícula	420 µm (no desengrasada)	41,0396 mgEAG/g	El pasante de la malla #80 (180µm sin desengrasar) evitara el desengrasado del grano conservado un buen rendimiento de extracción, evitando el uso de solventes tóxicos.
		180 µm (no desengrasada)	59,448 mgEAG/g	
		420 µm (desengrasada)	44,56 mgEAG/g	
		180 µm (desengrasada)	61,67 mgEAG/g	

ANEXO C. VARIACIÓN DEL CONTENIDO DE PT COMO FUNCIÓN DEL % INACTIVACIÓN ENZIMÁTICO



ANEXO D. RESULTADOS DEL DISEÑO DE LA INACTIVACIÓN.

T (°C)	t (min)	Inhibidor (mM)	Actividad Enzimática (U/mL*min)	Proteína [ug/mL]	Actividad Específica	Polifenoles Totales (mgGAE/g)	ω
Muestra no Tratada			2.194,50	68,51	32,03	42,09	
90	1	50	365,25	40,72	8,97	86,58	3,78
70	5	0	1.145,25	67,34	17,01	80,09	1,70
63	3	25	165,75	41,07	4,04	60,56	3,48
90	1	0	819,75	40,14	20,42	70,48	1,06
90	5	0	300,75	24,45	12,30	84,74	2,64
80	3	67	211,50	30,96	6,83	88,04	5,12
80	3	25	438,75	29,10	15,08	69,29	1,37
80	3	25	575,25	31,19	18,44	75,88	1,39
80	1	25	899,25	44,79	20,08	63,62	0,82
70	1	0	1.224,75	53,39	22,94	54,65	0,42
70	1	50	645,00	30,49	21,15	63,11	0,76
80	6	25	280,50	50,02	5,61	87,77	6,20
70	5	50	210,00	39,83	5,27	85,92	6,33
80	3	25	461,25	32,93	14,01	66,48	1,33
90	5	0	299,25	22,82	13,11	89,46	2,75
97	3	25	189,75	37,23	5,10	86,36	6,61
90	5	50	162,00	21,54	7,52	94,23	5,28
97	3	25	155,25	31,07	5,00	86,73	6,80
80	3	25	483,75	30,38	15,93	70,32	1,35
70	5	50	183,75	33,40	5,50	87,67	6,31
80	3	0	889,50	44,44	20,01	71,01	1,10
80	1	25	884,25	39,91	22,16	65,75	0,81
63	3	25	182,25	39,79	4,58	62,07	3,32
90	5	50	187,50	24,91	7,53	93,55	5,20
80	6	25	297,00	53,51	5,55	88,48	6,36
70	1	0	1.231,50	54,32	22,67	56,07	0,47
80	3	0	905,25	43,28	20,92	70,10	1,02
90	1	50	339,75	39,33	8,64	85,71	3,84
90	1	0	910,50	45,37	20,07	72,48	1,15
70	1	50	780,75	32,35	24,13	65,86	0,75
80	3	67	250,50	37,58	6,67	87,52	5,19
70	5	0	1.161,00	66,18	17,54	80,84	1,68

ANEXO E. RESULTADOS DEL DISEÑO DE EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES.

T (°C)	SS (m/v)	EA (v/v)	pH	Polifenoles Totales [mgEAG/gms]	Flavan-3-oles [mgCat/gms]	Flavonoides Totales [mgCat/gms]
60	1/30	25	5	78,219	62,297	35,073
50	1/24	50	4	93,800	79,644	48,197
50	1/40	50	3	99,229	55,872	39,634
60	1/60	75	3	102,687	57,477	44,412
40	1/30	75	3	93,495	77,299	42,700
60	1/60	25	3	90,675	52,362	41,438
50	1/40	50	3	97,391	53,843	37,924
40	1/30	75	3	95,753	68,774	40,918
50	1/40	50	6	98,395	66,453	59,971
50	1/40	50	4	95,383	67,968	51,195
50	1/120	50	4	107,230	53,738	54,234
50	1/40	50	6	97,341	64,314	60,872
60	1/30	75	3	97,243	73,108	47,435
50	1/40	50	4	95,944	63,011	48,039
40	1/30	75	5	81,067	76,181	51,268
40	1/30	25	5	76,048	61,208	42,570
40	1/60	75	5	91,699	49,339	42,629
60	1/30	25	3	82,549	59,527	39,784
60	1/60	75	5	89,577	57,786	59,471
50	1/40	100	4	47,106	15,179	22,985
40	1/60	25	3	84,444	50,934	38,135
40	1/30	25	3	76,545	55,744	43,722
40	1/60	25	3	83,755	51,827	39,469
30	1/40	50	4	88,677	74,733	42,424
70	1/40	50	4	99,550	79,730	57,679
60	1/60	25	3	81,407	55,262	39,247
40	1/30	25	5	78,218	59,041	46,605
40	1/60	75	3	100,689	46,016	29,063
60	1/30	25	5	80,892	64,102	38,843
50	1/120	50	4	104,317	55,912	55,176
60	1/30	75	5	83,064	74,425	56,353
50	1/40	0	4	44,313	22,400	21,660
40	1/60	25	5	77,254	56,349	42,154
50	1/40	0	4	41,169	17,089	25,352
30	1/40	50	4	90,617	77,912	41,150
40	1/30	25	3	78,651	58,509	39,195
60	1/30	75	5	84,015	75,473	53,616
60	1/30	25	3	82,476	59,466	35,934
60	1/60	75	5	88,048	57,955	55,582
50	1/40	50	4	90,025	69,192	45,516
60	1/60	25	5	85,341	59,554	44,329
50	1/24	50	4	100,238	86,045	53,870
70	1/40	50	4	98,160	82,046	58,201
60	1/60	75	3	97,268	53,520	45,829
60	1/30	75	3	98,293	72,946	50,853
50	1/40	50	4	92,742	64,193	46,331
40	1/30	75	5	81,562	70,545	48,221
50	1/40	50	4	90,300	65,813	51,060
50	1/40	50	4	91,394	64,086	50,288
40	1/60	25	5	78,391	51,529	40,634
40	1/60	75	3	98,980	45,006	33,707
60	1/60	25	5	86,554	56,650	41,068
50	1/40	100	4	47,153	15,196	23,892
40	1/60	75	5	92,098	48,267	46,688

ANEXO F. DIAGRAMAS DE PARETO: DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Diagram de Pareto Diseño de Inactivación:

Variable: ω

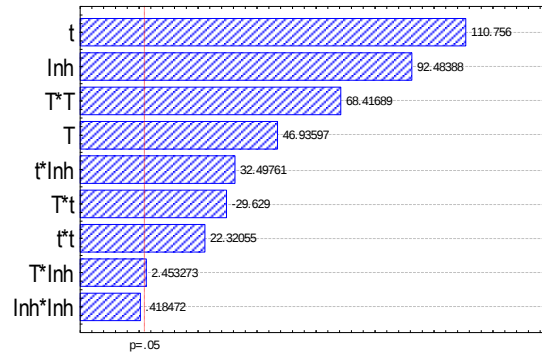


Diagrama de Pareto Diseño de Extracción Variable
Polifenoles Totales

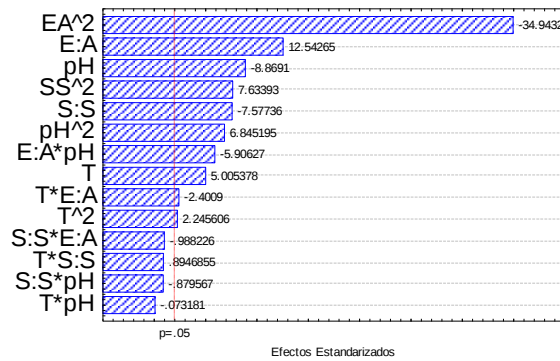


Diagrama de Pareto de los efectos principales
Variable: Flavan-3-Oles

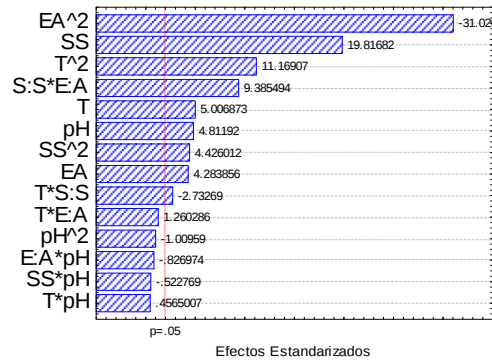
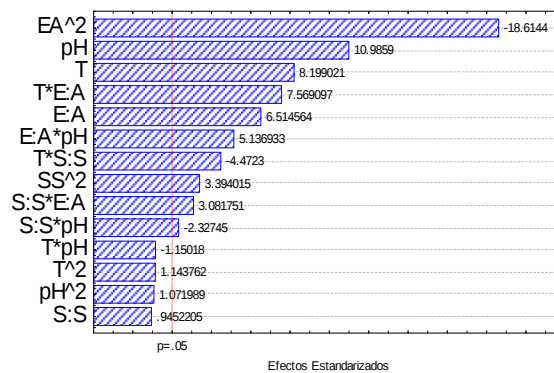


Diagrama de Pareto de los Efectos Principales
Flavonoides Totales



ANEXO G. TABLA DE RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA

ANOVA

a. Análisis de varianza ANOVA Diseño de Inactivación

Factores	Coefficientes de Regresión	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Suma media de Cuadrados	F	p
Bo	57,40447					0,000762
T	-1,57100	9,02	1	9,020	2202,9856	0,000000
T*T	0,01065	19,16	1	19,165	4680,8708	0,000000
t	1,79843	50,22	1	50,224	12266,8951	0,000000
t*t	0,09129	2,04	1	2,040	498,2071	0,000000
%Inhi	0,01116	35,02	1	35,019	8553,2687	0,000000
%Inhi*%Inhi	0,00001	0,00	1	0,001	0,1751	0,680841
T*t	-0,02370	3,59	1	3,594	877,8748	0,000000
T*%Inhi	0,00016	0,02	1	0,025	6,0185	0,025244
t*%Inhi	0,01040	4,32	1	4,324	1056,0948	0,000000
Falta de ajuste	293,6772242	18,06	5	3,611	881,9771	0,000000
Error	-----	0,07	17	0,004		
Total SS	-----	153,85	31			
R-cuad=0,88219 ; R-cuad. Ajust.=0,834						

b. Análisis de varianza ANOVA Polifenoles Totales

Factores	Coefficientes de Regresión	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Suma media de Cuadrados	F	p
Bo	104,36					0,000762
T	-0,49	121,89	1	121,892	9,9872	0,003044
T*T	0,01	24,53	1	24,534	2,0102	0,164187
S:S	-2063,89	279,34	1	279,342	22,8878	0,000025
SS*S:S	36443,83	283,53	1	283,529	23,2309	0,000022
E:A	2,62	765,38	1	765,383	62,7115	0,000000
E:A*E:A	-0,02	5940,53	1	5940,527	486,7358	0,000000
pH	-19,01	382,70	1	382,701	31,3565	0,000002
pH*pH	2,72	227,97	1	227,967	18,6784	0,000103
T*S:S	4,19	3,89	1	3,894	0,3191	0,575392
T*E:A	0,00	28,04	1	28,045	2,2978	0,137619
T*pH	0,00	0,03	1	0,026	0,0021	0,963383
S:S*E:A	-1,85	4,75	1	4,751	0,3893	0,536302
S:S*Ph	-41,16	3,76	1	3,764	0,3084	0,581839
E:A*Ph	-0,09	169,72	1	169,718	13,9058	0,000610
Falta de ajuste	-----	334,90	10	33,490	6,8840	0,000021
Error	-----	475,99	39	12,205		
Total SS	-----	10988,69	53			
R-cuad=0,95668 ; R-cuad. Ajust.=0,94113						

c. Análisis de varianza ANOVA Flavan-3-oles

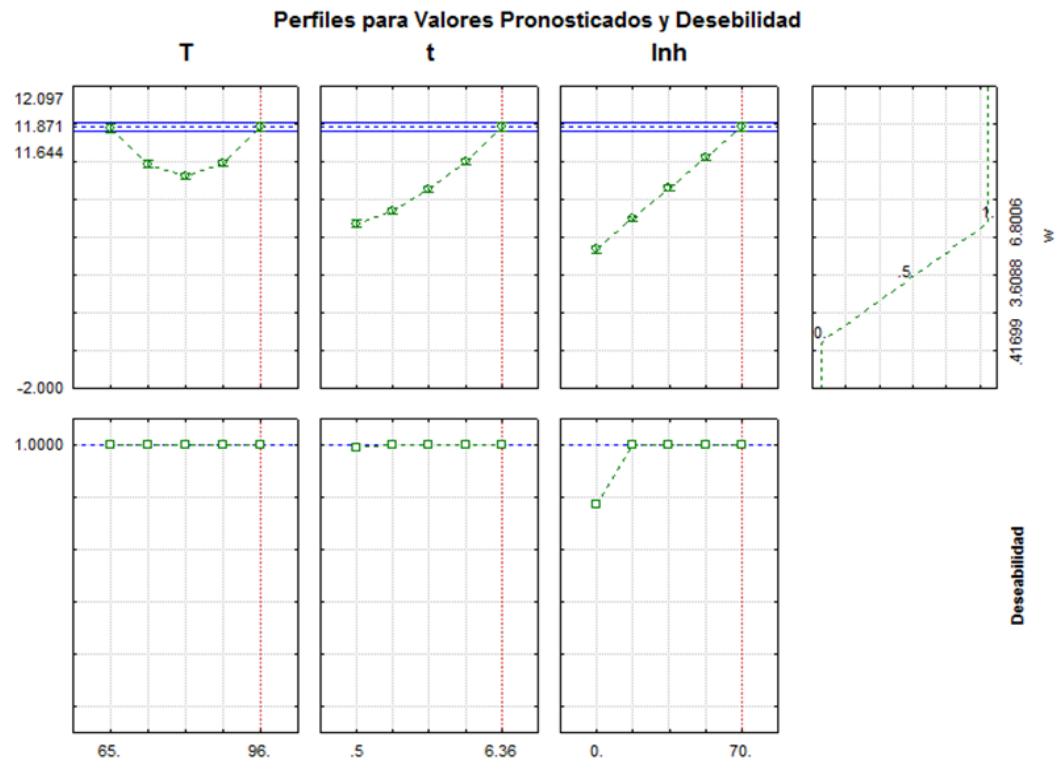
Factores	Coefficientes de Regresión	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Suma media de Cuadrados	F	p
Bo	99,20					0,000762
T	-3,71	145,61	1	145,612	25,0688	0,000025
T*T	0,04	724,60	1	724,600	124,7481	0,000000
S:S	-481,34	2281,04	1	2281,037	392,7065	0,000000
SS*S:S	23087,14	113,79	1	113,786	19,5896	0,000125
E:A	1,33	106,59	1	106,594	18,3514	0,000184
E:A*E:A	-0,02	5591,41	1	5591,412	962,6252	0,000000
pH	5,69	134,49	1	134,493	23,1546	0,000043
pH*pH	-0,44	5,92	1	5,920	1,0193	0,321044
T*S:S	-13,97	43,38	1	43,376	7,4676	0,010587
T*E:A	0,00	9,23	1	9,226	1,5883	0,217613
T*pH	0,02	1,21	1	1,210	0,2084	0,651431
S:S*E:A	19,19	511,66	1	511,657	88,0875	0,000000
S:S*Ph	-26,73	1,59	1	1,587	0,2733	0,605107
E:A*Ph	-0,01	3,97	1	3,972	0,6839	0,415005
Falta de ajuste	-----	417,41	10	41,741	7,1863	0,000014
Error	-----	168,45	29	5,809		
Total SS	-----	12768,38	53			
R-cuad=0,95412 ; R-cuad. Ajust.=0,93765						

d. Análisis de varianza ANOVA Flavonoides Totales

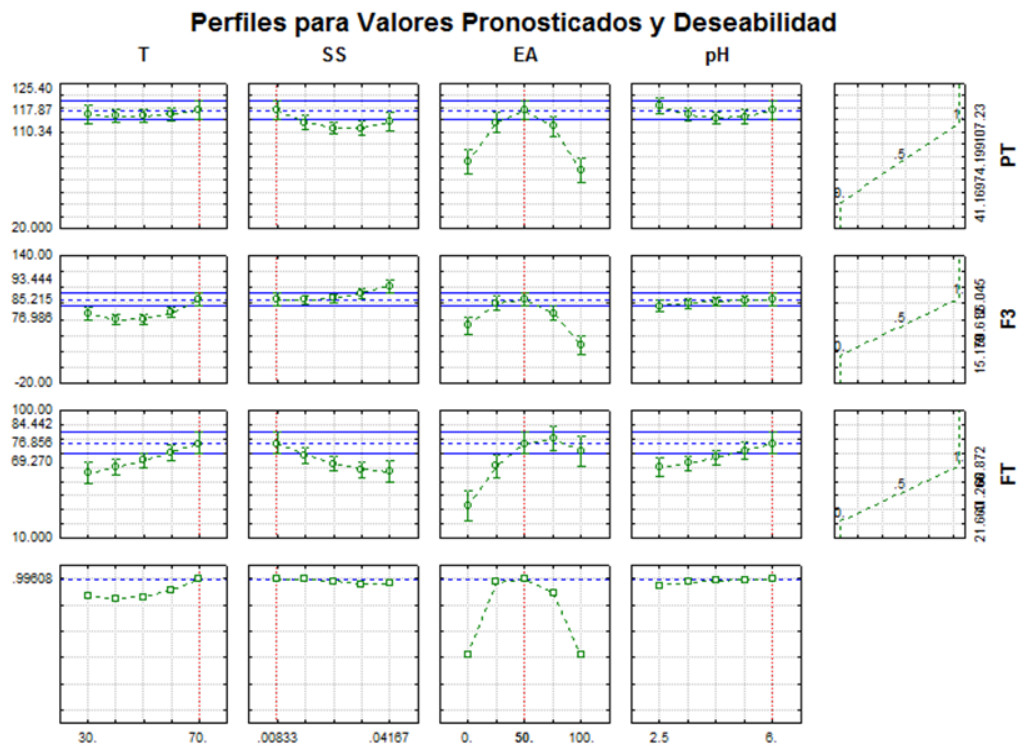
Factores	Coefficientes de Regresión	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Suma media de Cuadrados	F	p
Bo	23,39					0,000762
T	331,82	1,00	332	67,224	0,0000	0,000025
T*T	6,46	1,00	6	1,308	0,2621	0,000000
S:S	4,41	1,00	4	0,893	0,3524	0,000000
SS*S:S	56,86	1,00	57	11,519	0,0020	0,000125
E:A	209,48	1,00	209	42,440	0,0000	0,000184
E:A*E:A	1710,30	1,00	1710	346,496	0,0000	0,000000
pH	595,72	1,00	596	120,690	0,0000	0,000043
pH*pH	5,67	1,00	6	1,149	0,2926	0,321044
T*S:S	98,73	1,00	99	20,001	0,0001	0,010587
T*E:A	282,79	1,00	283	57,291	0,0000	0,217613
T*pH	6,53	1,00	7	1,323	0,2595	0,651431
S:S*E:A	46,88	1,00	47	9,497	0,0045	0,000000
S:S*Ph	26,74	1,00	27	5,417	0,0271	0,605107
E:A*Ph	130,25	1,00	130	26,388	0,0000	0,415005
Falta de ajuste	293,6772242	10,00	29	5,950	0,0001	0,000014
Error	-----	143,14	29	4,936		
Total SS	-----	4622,15	53			
R-cuad=0,90549 ; R-cuad. Ajust.=0,87157						

ANEXO H. GRÁFICOS DE LOS EFECTOS PRICIPALES

a. Gráficos de los efectos principales en la inactivación.

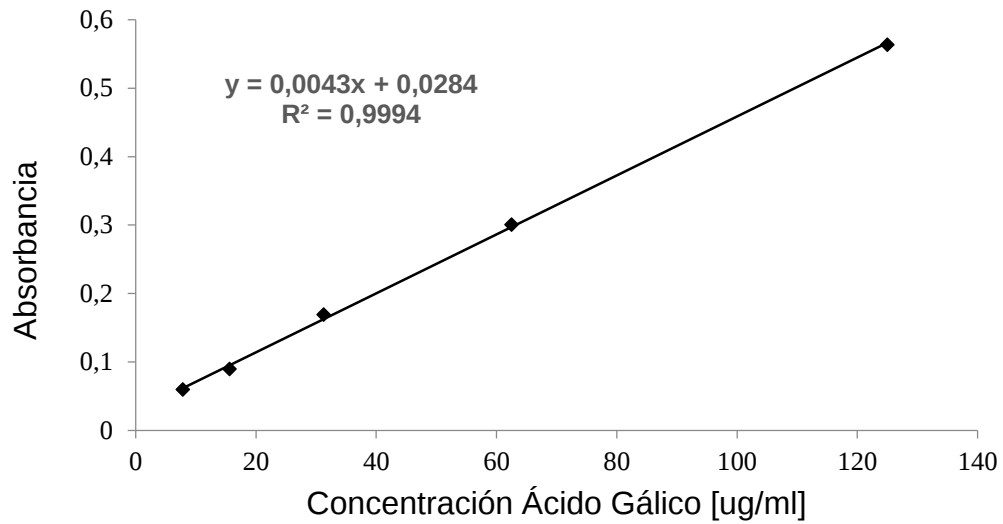


b. Gráficos de los efectos principales en la extracción.

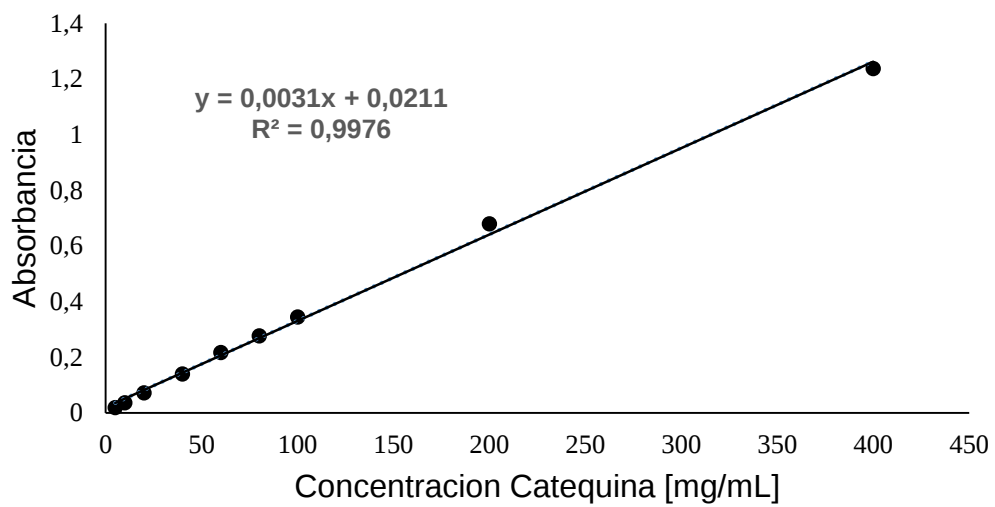


ANEXO I. CURVAS DE CALIBRACIÓN

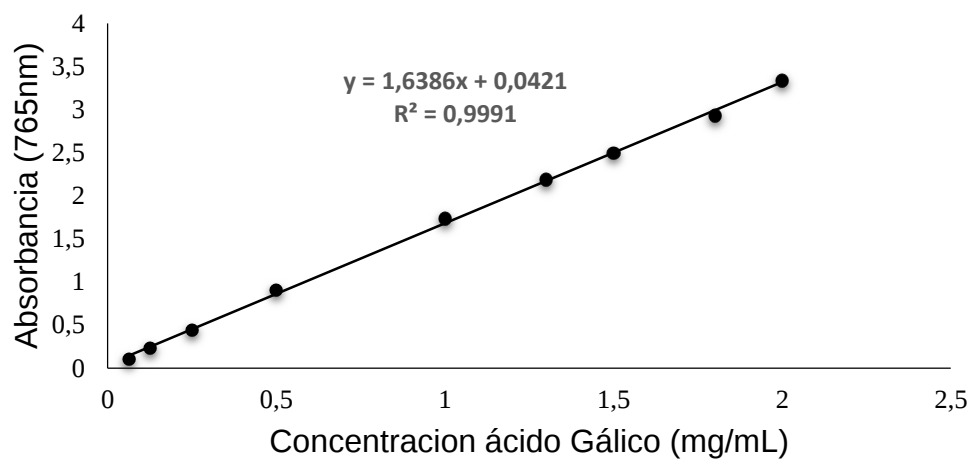
Curva de calibración Proteína BSA



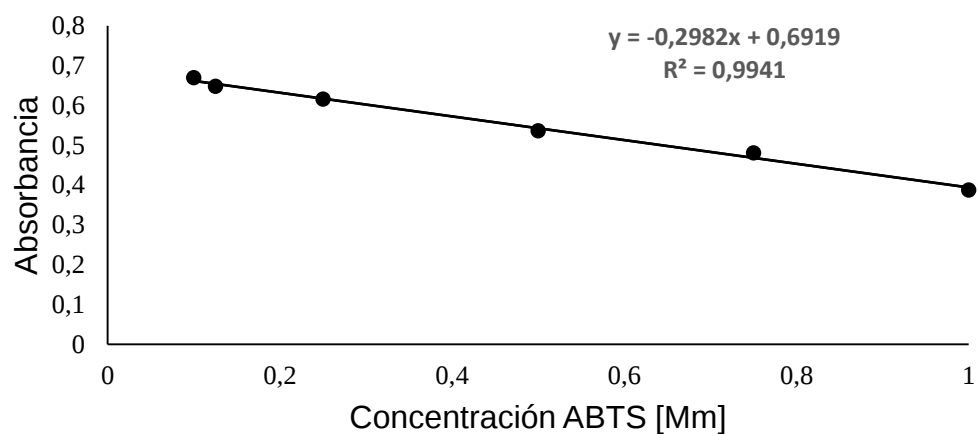
Curva de Calibración Catequina



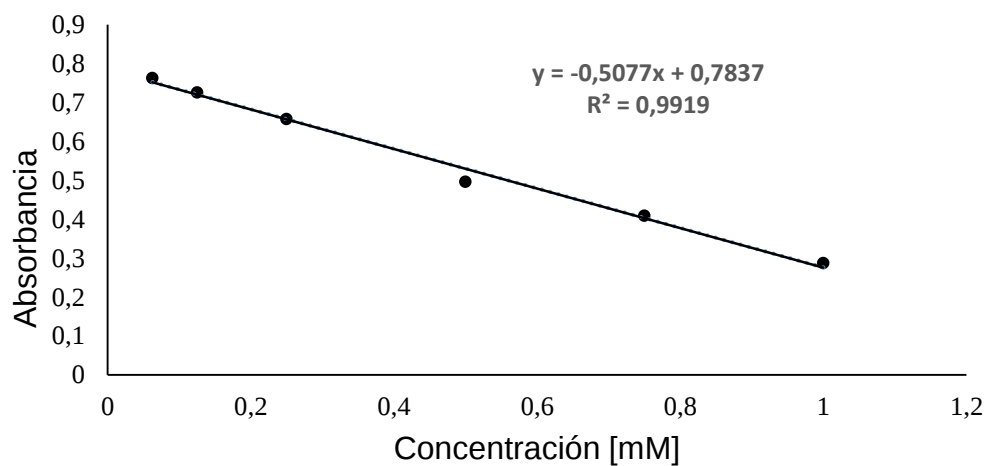
Curva de Calibración Ácido Gálico

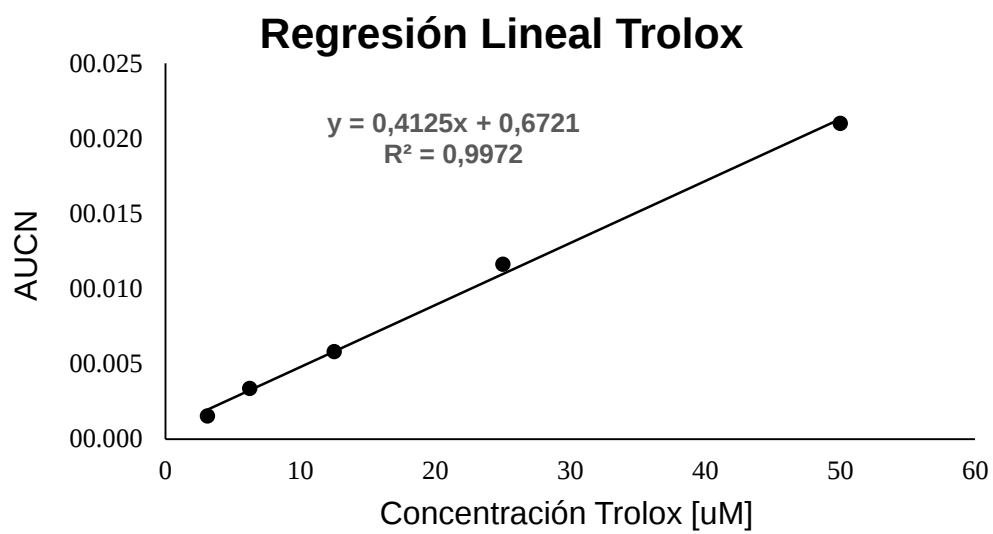


ABTS



Curva de calibración DPPH





**ANEXO J. DATOS DEL SEGUIMIENTO DE LA EXTRACCIÓN DE
ANTIOXIDANTES: CINÉTICA**

Tiempo [min]	Polifenoles Totales [mgEAG/gms]	Flavan-3-Oles [mgCat/gms]	Flavonoides Totales [mgCat/gms]
0,5	76,91 ± 4,3	54,08 ± 2,5	46,26 ± 2,2
0,8	80,54 ± 3,1	64,87 ± 0,6	48,22 ± 4,1
1	90,74 ± 2,1	65,12 ± 6,5	54,15 ± 2,0
3	87,41 ± 4,6	64,56 ± 6,6	57,47 ± 4,7
5	88,05 ± 6,8	65,26 ± 6,3	56,28 ± 4,7
7	87,1 ± 3,3	71,9 ± 3,2	55,14 ± 2,5
9	88,25 ± 4,3	69,55 ± 3,1	57,42 ± 0,0
10	92,62 ± 4,6	71,21 ± 5,1	58,02 ± 0,6
15	99,35 ± 2,2	72,01 ± 3,5	60,2 ± 0,9
20	99,07 ± 4,5	71,18 ± 4,7	60,4 ± 1,5
25	102,57 ± 6,5	72,43 ± 4,7	59,65 ± 3,5
30	102,47 ± 7,2	76,3 ± 3,8	60,05 ± 1,9
60	102,75 ± 2,6	67,86 ± 3,8	62,72 ± 4,9
90	104,5 ± 5,9	68,85 ± 5,2	60,68 ± 4,3
120	102,84 ± 5,4	74,23 ± 6,4	61,83 ± 2,1
150	105,42 ± 2,2	75,75 ± 6,4	61,93 ± 2,4
180	105,61 ± 0,6	76,16 ± 7,0	62,33 ± 4,0