POTENCIAL COLORANTE Y CITOTÓXICO DE EXTRACTOS DE FLAVONOIDES OBTENIDOS A PARTIR DE EPICARPIO DE CÁSCARA DE CACAO

JESÚS ANDRÉS OÑATE GUTIÉRREZ

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2021

POTENCIAL COLORANTE Y CITOTÓXICO DE EXTRACTOS DE FLAVONOIDES OBTENIDOS A PARTIR DE EPICARPIO DE CÁSCARA DE CACAO

JESÚS ANDRÉS OÑATE GUTIÉRREZ

Trabajo de Investigación para optar al título de Magíster en química

Director del proyecto
Julio Roberto Pinzón Joya, Químico PhD

Codirector del proyecto

Cristian Blanco Tirado, Químico PhD

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA
BUCARAMANGA
2021

DEDICATORIA

A la fuente de toda sabiduría y conocimiento, mi Dios, quien me ha permitido alcanzar todos mis logros, y a mi familia, mi novia y mis amigos, por su amor y compañía.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por ser la razón y la garantía de cualquiera de mis éxitos. A la **Universidad Industrial de Santander**, por brindarme todas las herramientas científicas, académicas y económicas. A mi director **Julio Roberto Pinzón**, por su gestión, confianza y amistad durante el proyecto, al profesor **Cristian Blanco**, por su codirección y enseñanza y a la profesora **Yajaira Combariza**, por su participación durante el ejercicio investigativo.

Al grupo de investigación **GIFTEX** por permitirme el uso de sus espacios físicos, reactivos y equipos necesarios para el desarrollo del proyecto. Al químico **Luis Miguel Díaz** por su gran ayuda investigativa y por su valiosa amistad. Al grupo **CINTROP**, a la profesora **Stelia** y especialmente a **Diana**, por su colaboración en los ensayos biológicos. Al grupo **CODEIM**, al profesor **Arnold**, al grupo **GIMBA**, al grupo de espectroscopía **LEAM**, al profesor **Cabanzo** y a **Ximena**. Al técnico **Manuel** por su gestión y amistad.

A mis padres: **Martha** y **Jorge Luis**, por su amor y dedicación y a mis hermanos: **Jose**, **María**, **Stefania**, **Daniela** y **Nicolas**. A mis amigos de la universidad: **Jose**, **Pipe** y **Wilmar**, mis amigos de maestría: **Juan Camilo**, **Mary**, **Sebastián**, **Paula**, **Silvia**, **Cindy** e **Ivette** y a mis amigos en Cristo, por todo su apoyo y estima.

CONTENIDO

pág.

INTRODUCCIÓN 15

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 16

1.2 JUSTIFICACIÓN 17

1.3 HIPÓTESIS 19

1.4 OBJETIVOS 20

1.4.1 Objetivo general 20

1.4.2 Objetivos específicos 20

2. MARCO REFERENCIAL 21

2.1 MARCO TEÓRICO 21

2.1.1 El cacao. 21

2.1.2 Características y composición del fruto de cacao 23

2.1.3 Aplicaciones del fruto de cacao 26

2.1.5 Uso de colorantes en la industria 31

2.1.6 Flavonoides 35

2.2 ANTECEDENTES 38

3. MATERIALES Y MÉTODOS 42

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS 42

3.2 TRATAMIENTO Y LIOFILIZACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE CACAO 42
3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES 43
3.4 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.....45
3.5 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN LOS EECC EMPLEANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF.....45
3.6 EVALUACIÓN DE PROPIEDADES COLORANTES 46
3.7 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....47

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....48
4.1 TRATAMIENTO Y LIOFILIZACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE CACAO 48
4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES 49
4.3 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.....55
4.4 ANÁLISIS DEL PERFIL DE FLAVONOIDES DE LOS EECC EMPLEANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF.....57
4.5 EVALUACIÓN DE PROPIEDADES COLORANTES 71
4.6 EVALUACIÓN DE PROPIEDADES CITOTÓXICAS.....79

5. CONCLUSIONES 81

6. RECOMENDACIONES 82
BIBLIOGRAFÍA.....83

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Composición química de la cáscara, la cascarilla y del mucílago de cacao 25

Tabla 2. Colorantes y pigmentos empleados en la industria de alimentos 33

Tabla 3. Reactivos y equipos empleados durante la investigación 42

Tabla 4. Variables y niveles evaluados en el diseño experimental 43

Tabla 5. Condiciones establecidas para la obtención de los extractos de epicarpio de cáscara de cacao (EECC) 44

Tabla 6. Características de las cáscaras de cacao liofilizadas 48

Tabla 7. Absorbancias a 283 nm de los extractos de flavonoides del epicarpio de cáscara de cacao 50

Tabla 8. Análisis de varianza para la Absorbancia (283 nm) 52

Tabla 9. Rendimientos de extracción 54

Tabla 10. Polifenoles totales en los EECC 56

Tabla 11. Compuestos identificados en el espectro LDI del EECC rojo 59

Tabla 12. Compuestos identificados en los espectros MALDI-TOF del EECC Amarillo empleando las matrices: DCTB, CNFV-CH_3 y CNFV-OCH_3 63

Tabla 13. Compuestos identificados en los espectros MALDI-TOF del EECC Rojo empleando las matrices: DCTB, CNFV-CH_3 y CNFV-OCH_3 66

Tabla 14. Compuestos identificados en los espectros MALDI-TOF del EECC Vino tinto empleando las matrices: DCTB, CNFV-CH_3 y CNFV-OCH_3 68

Tabla 15. Compuestos identificados en los EECC Amarillo, Rojo y Vino tinto 69

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Árbol y mazorcas de cacao 21

Figura 2. Características de los tipos de cacao: criollo, forastero y trinitario 22

Figura 3. Estructura del fruto de cacao 24

Figura 4. Producción de granos de cacao y procesos de manufactura 27

Figura 5. Producción de cacao en Colombia 30

Figura 6. Ejemplos de colorantes artificiales y naturales 31

Figura 7. Estructura y principales tipos de flavonoides 35

Figura 8. Biosíntesis de flavonoides 37

Figura 9. Elaboración de jabón a partir de cáscaras de cacao 39

Figura 10. Espectros UV-Vis de los EECC amarillos obtenidos por el diseño experimental 50

Figura 11. Diagrama de Pareto 51

Figura 12. Coordenadas obtenidas del diseño experimental 53

Figura 13. Espectros UV-Vis de los EECC 54

Figura 14. Curva de calibración de ácido gálico 56

Figura 15. Espectros LDI de los EECC amarillo, rojo y vino tinto 58

Figura 16. Espectros LDI de las matrices DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH3 61

Figura 17. Espectros MALDI-TOF del EECC amarillo empleando DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3 como matrices ET MALDI 62

Figura 18. Espectros MALDI-TOF del EECC Rojo empleando DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3 como matrices ET MALDI 65

Figura 19. Espectros MALDI-TOF del EECC Vino tinto empleando DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3 como matrices ET MALDI 67

Figura 20. Alcaloides, ácidos fenólicos y flavonoides reportados en el grano y la cáscara de cacao 70

Figura 21. Impregnación de cubos de CB a presión atmosférica y al vacío con soluciones acuosas de EECC 72

Figura 22. Cinética de coloración y decoloración de cubos de CB con soluciones acuosas de EECC 75

Figura 23. Muestras de yogurt coloreadas con EECC 75

Figura 24. Estabilidad del color en muestras de yogurt 76

Figura 25. Variación del color de los EECC a distinto pH 77

Figura 26. Espectros de reflectancia difusa de los EECC 79

Figura 27. Efecto de los EECC sobre la viabilidad celular de la línea celular VERO 79

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ANOVA	Analysis Of Variance (Análisis de Varianza)
CB	Celulosa Bacteriana
CNFV-CH_3	*α-Methyl-cyanophenylenevinylene* (α-Metilo-cianofenilenvinileno)
CNFV-OCH_3	*α-Methoxy-cyanophenylenevinylene* (α-Metoxi-cianofenilenvinileno)
DCTB	*trans-2-[3-(4-tert-butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malonitrile* (*trans*-2-[3-(4-tert-butilfenil)-2-metil-2-propeniliden)malonitrilo)
ECC	Epicarpio de Cáscara de cacao
EECC	Extracto de Epicarpio de Cáscara de Cacao
EI	*Electronic Ionization* (Ionización Electrónica)
ET	Electronic Transfer (Transferencia Electrónica)
FC	Folin-Ciocalteu
HPLC	*High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
LDI	*Laser Desorption Ionization* (Desorción Ionización Láser)
m/z	Relación masa/carga
MALDI	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (Desorción Ionización Láser con Matriz Asistida)
MTT	*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
VERO	*Kidney epithelial cells extracted from African Green money*

	(Chlorocebus sp.) Células epiteliales de riñón extraídas de mono verde africano
UV-Vis	Espectroscopia de Ultravioleta Visible

RESUMEN

TÍTULO: Potencial colorante y citotóxico de extractos de flavonoides obtenidos a partir de epicarpio de cáscara de cacao*

AUTOR: Jesús Andrés Oñate Gutiérrez

PALABRAS CLAVE: Epicarpio de cáscara de cacao, extracción, flavonoides, propiedades colorantes, propiedades citotóxicas.

DESCRIPCIÓN: La cáscara de cacao es el subproducto más voluminoso del proceso de manufactura del cacao y representa una gran oportunidad como fuente de derivados agrobasados para la industria de alimentos. Iniciando desde mazorcas de cacao de tres colores distintos (amarillo, rojo y vino tinto) de Santander – Colombia, fueron obtenidos extractos de epicarpio de cáscara de cacao (EECC) ricos en flavonoides. Un diseño factorial 2^3 fue llevado a cabo variando la temperatura, el pH y la relación EtOH:H_2O para optimizar las condiciones de extracción. A partir de los EECC, se determinó el contenido de polifenoles totales usando el método de Folin-Ciocalteu, se identificó el perfil de flavonoides mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (DCTB, α-CNFV-OCH_3 and α-CNFV-CH_3 matrices), se evaluaron las propiedades colorantes con experimentos de tinción sobre cubos de celulosa bacteriana y muestras de yogurt y se determinaron las propiedades citotóxicas mediante un ensayo MTT con células Vero. Los resultados muestran las condiciones óptimas de extracción (relación EtOH:H_2O 80:20, 30 °C, sin agregar HCl) explicando el 80 % de la varianza. En el perfil de flavonoides MALDI-TOF fueron identificados 15 picos en los EECC de acuerdo a las bases de datos de polifenoles y el EECC vino tinto registró la mayor cantidad de polifenoles (194 mg EAG/g de EECC). Los tres EECC mostraron tinción efectiva sobre los cubos de celulosa bacteriana y las muestras de yogurt y no reportaron actividad citotóxica sobre las células Vero, lo que permite considerar a los EECC como candidatos pertinentes a colorantes alimentarios.

---

*Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Julio Roberto Pinzón Joya, Químico PhD. Codirector: Cristian Blanco Tirado

ABSTRACT

TITLE: Colorant and Cytotoxic Activity of Flavonoid Extracts Obtained from Cocoa Pod Husk Epicarp*

AUTHOR: Jesús Andrés Oñate Gutiérrez

KEYWORDS: Cocoa pod husk epicarp, Extraction, Flavonoids, Colorant properties, Cytotoxic properties.

DESCRIPTION: Cocoa Pod Husk (CPH) is the most voluminous by-product of the cocoa manufacturing process and represents a great opportunity as a source of agro-based derivatives for the food industry. Starting from cacao pods of three different colors (yellow, red and purple) from Santander – Colombia were obtained Cocoa Pod Husk Epicarp (CPHE) extracts rich on flavonoids. A factorial design 2^3 was carried out varying the temperature, pH and EtOH:H_2O mixture ratio for to optimize extraction conditions. From CPHE, total polyphenols were determinate using Folin-Ciocalteu method, flavonoid profile were identified by MALDI-TOF Mass Spectrometry (DCTB, α-CNFV-OCH_3 and α-CNFV-CH_3 matrices), colorant properties were evaluated with dyeing experiments on bacterial cellulose cubes and yogurt samples and cytotoxic properties were determinate by MTT assay. The results showed extraction optimal conditions (EtOH:H_2O mixture ratio 80:20, 30 °C and neutral pH) explaining the 80 % of the variance. In the MALDI-TOF flavonoid profile were identified total 15 peaks in the CPHE extracts according to polyphenol databases, the purple CPHE extract recorded the highest among of phenolics (194 mg GAE/g CPHE extract). The three CPHE extracts achieved high dyeing percentages on bacterial cellulose cubes and yogurt samples, furthermore, these CPHE extracts didn´t show cytotoxic activity on Vero cells, allow to consider them as good colorant additives with important cytotoxic activity to the human diet.

---

*Research work

** Faculty of Sciences. School of Chemistry. Director: Julio Roberto Pinzón Joya, Chemist, PhD.

Codirector: Cristian Blanco Tirado, Chemist, PhD.

INTRODUCCIÓN

El sector cacaotero ocupa un lugar muy importante dentro de las agroindustrias colombianas. De acuerdo a la producción mundial de cacao, el país ocupa el décimo lugar con un aporte de 59.740 toneladas,[1] se reporta una extensión de 176.050 hectáreas sembradas en el territorio nacional, y toda nuestra producción entra en la categoría de cacao fino y de aroma, que solo constituye el 5 % del cacao producido mundialmente.[2] Alrededor del sistema de beneficio de cacao, se han generado diversos productos intermedios y bienes finales, los cuales han sido posicionados preferencialmente en los mercados de altos ingresos en el mundo.

Uno de los grandes retos de esta industria es la implementación del concepto de biorefinería, en el cual se busca aprovechar al máximo cada uno de los componentes de la mazorca de cacao (cáscara, mucílago, cascarilla y semilla) y generar un mayor número de productos finales con alto valor comercial. Inicialmente, en el sistema tradicional de beneficio de cacao, se producen a partir de los granos: licor de cacao, manteca de cacao, cocoa en polvo y todos los derivados de la industria del chocolate.[3] En cuanto a los subproductos orgánicos generados, que representan casi el 90 % de la cantidad tratada, se han implementado muchas aplicaciones de gran utilidad. Podemos resaltar los exudados de cacao, de los cuales se pueden generar jaleas, mermeladas, bebidas y nata; los jugos fermentados de cacao, que sirven como materia prima de edulcorantes y bebidas alcohólicas, y la cáscara de cacao, la cual se puede emplear como alimento para rumiantes, elaboración de jabones, o como fuente de extractos y colorantes para la industria farmacéutica, cosmética y de alimentos.[4]

---

[1] FEDECACAO. Datos Economía Nacional; 2020.
[2] ABBOTT, Philip, *et al*. Análisis de La Cadena Productiva Del Cacao En Colombia; 2019.
[3] PROCOLOMBIA. Cacao y sus derivados. www.procolombia.com (accessed Oct 22, 2019).
[4] ODDOYE, Emmanuel.; M.PHIL, Christian.; GYEDU-AKOTO, Esther. Cocoa and Its By-Products: Identification and Utilization. In Chocolate in Health and Nutrition; 2013; pp 23–37.

Para el caso específico de las cáscaras de cacao, las cuales son el subproducto generado de mayor volumen, se propone en el presente trabajo la extracción de compuestos coloreados que sirvan como aditivos naturales en la industria alimentaria, y en donde se aprovechen sus propiedades colorantes y biológicas. Esto permitirá ampliar el conocimiento biotecnológico y el aprovechamiento agroindustrial que se le da a este tipo de materia orgánica.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cacao es uno de los sectores agroindustriales más importantes en Colombia. Este sector logró en el 2018 el mayor índice de crecimiento económico en cuanto a producción, ventas y empleo dentro de su categoría.[5] Ha generado también un amplio portafolio en el comercio internacional, logrando exportaciones a más de 33 países, y las condiciones agroecológicas óptimas en que se cultiva permiten producir un grano catalogado como fino y de aroma, el cual constituye solo el 5 % del cacao producido en el mundo.[3] No obstante, la industria cacaotera presenta diversos problemas con el tratamiento y la no utilización de los subproductos orgánicos generados, los cuales representan el 90% del peso total de la producción.[6]

En el sistema de beneficio de cacao, por cada tonelada de semilla seca, se generan 10 toneladas de cáscara de cacao, y por cada 800 kilos de semilla fresca, se generan 40 litros de pulpa o exudado de cacao. A estos subproductos se suman los frutos descartados por enfermedades y la cascarilla de cacao producida después del tostado del grano.

---

[5] COLOMBIA: BALANCE 2018 Y PERSPECTIVAS 2019; 2018.
[6] MEJÍA, Luis.; ARGUELLO, Orlando. Tecnología Para El Mejoramiento Del Sistema de Producción de Cacao; *Corpoica*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria: Bucaramanga, 2000.

Analizando específicamente las cáscaras de cacao, éstas generan problemas en muchas fincas productoras, ya que los cacaoteros al poseer poco conocimiento de aprovechamiento agroindustrial, acostumbran a acumular y depositar las cáscaras en el área de quiebre. El proceso de descomposición de las cáscaras, favorece la proliferación de microorganismos patógenos, más aún, la forma cóncava de las cáscaras favorece el almacenamiento de agua de lluvia, lo que facilita la proliferación de insectos y especies *Phytophthora* que ocasionan enfermedades en los cultivos.[7]

Es importante recordar que la cáscara de cacao compone hasta el 76 % de los frutos[8] y ya que éste es el subproducto más voluminoso del beneficio del cacao, muchos investigadores se han propuesto desarrollar nuevos procedimientos y transformaciones que permitan aprovechar al máximo este tipo de subproductos, generar conocimiento científico en el sector cacaotero, y aumentar ingresos para cultivadores y empresarios con la elaboración de nuevos productos.

1.2 JUSTIFICACIÓN

Ante la preocupación por buscarle un mejor aprovechamiento a los subproductos del procesamiento de cacao, específicamente, a las cáscaras de cacao, se han desarrollado muchas aplicaciones interesantes que pueden agregarle un valor comercial a este subproducto. Se ha reportado que la cáscara de cacao puede emplearse como base para alimento de rumiantes,[9] para la elaboración de jabones,

---

[7] ORTIZ, Kely.; ÁLVAREZ, Ricardo. Efecto Del Vertimiento de Subproductos Del Beneficio de Cacao (Theobroma Cacao L.) Sobre Algunas Propiedades Químicas y Biológicas En Los Suelos de Una Finca Cacaotera, Municipio de Yaguará (Huila, Colombia). *Boletín Científico. Cent. Museos. Mus. Hist. Nat.* 2015, vol 19, nro 1, pp 65–84.

[8] CAMPOS-VEGA, Rocio.; NIETO-FIGUEROA, K. H.; OOMAH, B. D. Cocoa (Theobroma Cacao L.) Pod Husk: Renewable Source of Bioactive Compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 2018.

[9] LACONI, Erika. B.; Jayanegara, ANURAGA. Improving Nutritional Quality of Cocoa Pod (Theobroma Cacao) through Chemical and Biological Treatments for Ruminant Feeding: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 2015, vol 28, nro 3, pp 343–350.

ya que sus cenizas poseen un alto contenido de potasio,[10] y por procesos de pirólisis y reacciones catalíticas, se pueden generar compuestos orgánicos de uso industrial y sintético como: acetona, 2-butanona, fenol, cresol, xileno, etc.[11]

Una oportunidad de aprovechamiento que podría resultar importante para la cáscara de cacao, consiste en la extracción y el aislamiento de compuestos coloreados desde su capa más externa (epicarpio). Los colores que se observan en las mazorcas de cacao, generalmente rojo, amarillo, naranja, vino tinto y otras tonalidades, se deben principalmente a la presencia de flavonoides, los cuales son compuestos polifenólicos que componen la dieta humana, y que aportan muchos beneficios a la salud por su capacidad antioxidante, citotóxica, antibacterial, su modulación del estrés oxidativo y su efecto cardioprotector. Existen muchas familias de flavonoides distribuidas ampliamente en el reino vegetal, y a su vez, estas familias se relacionan con colores específicos que se pueden emplear como aditivos colorantes, tales como: flavonas (blanco-crema), chalconas (amarillo), auronas (amarillo) y antocianinas (rojo-azul).[12]

Para la extracción de flavonoides desde la cáscara, se emplean diversos métodos tales como: extracción con disolventes orgánicos, algunas veces asistida por radiación de microondas o por ultrasonido, extracción usando fluido supercrítico, generalmente CO_2 supercrítico, o extracción con líquido presurizado. En el aislamiento de los flavonoides también se tiene en cuenta que éstos son compuestos lábiles térmicamente, y que se encuentran glicosidados o acilados dentro del material vegetal.[13]

---

[10] KUMI, Winifred, *et al*. A Manual for Extraction of Cocoa Potash and Production of Cocoa Soft Soap; *Cocoa Research Institute of Ghana*: Ghana, 2012.
[11] MANSUR, Dieni, *et al*. Conversion of Cacao Pod Husks by Pyrolysis and Catalytic Reaction to Produce Useful Chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 2014, vol 66.
[12] LOCK, Olga. *Colorantes Naturales*, ed 1.; Fondo Editorial PUCP, Ed.; Lima, 1997.
[13] GROTEWOLD, Erich., The Science of Flavonoids, Ed 1.; *Springer-Verlag New York*, 2006.

Dicho lo anterior, se propone la obtención de extractos de epicarpio de cáscara de cacao ricos en flavonoides, los cuales puedan ser aprovechados en la industria de alimentos por sus propiedades colorantes y citotóxicas; generando así nuevas alternativas de agro-transformación para este subproducto del cacao.

1.3 HIPÓTESIS

Es posible obtener extractos de epicarpio de cacao ricos en flavonoides con potencial colorante y citotóxico en la industria de alimentos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- ✓ Generar extractos de flavonoides a partir de epicarpio de cáscara de cacao con propiedades colorantes y citotóxicas aplicables en la industria alimentaria.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obtener tres extractos de epicarpio de cáscara de cacao (EECC) coloreados empleando extracción con disolventes
- ✓ Caracterizar químicamente el perfil de flavonoides de los EECC mediante espectrometría de masas MALDI-TOF
- ✓ Estudiar las propiedades colorantes y citotóxicas de los EECC

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 MARCO TEÓRICO

2.1.1 El cacao. El cacao, *Theobroma cacao*, es un árbol tropical del orden *Malvales* y la familia *Esterculiacea*. Su origen se remonta a la época precolombina, en la cual los indígenas y las tribus nativas cultivaron el cacao en regiones extendidas desde el Orinoco y Amazonas hasta México, antes de la llegada de los españoles. Después, en la época post-colonial, el fruto fue llevado a España debido a sus usos culinarios, y su aceptación incentivó el desarrollo de tecnologías de tostado y prensado, y de expansión de sus cultivos a otros continentes como África.

En su descripción botánica, el árbol de cacao se puede clasificar entre las plantas hidromegatermas, es decir, aquellas que necesitan temperatura y humedad relativa altas (para el cacao, humedad relativa del 75 % y temperaturas no inferiores a 18 °C). Esta planta crece en regiones desde 100 hasta 1200 metros sobre el nivel del mar, posee un ciclo vegetativo perenne, un número de cromosomas 2n = 20, polinización alógama y un sistema de reproducción que puede ser sexual o asexual.

Figura 1. Árbol y mazorcas de cacao

FUENTE: Autor

Morfológicamente, la planta de cacao está formada por una raíz pivotante que puede alcanzar 1,5 metros de profundidad; posee un tallo no continuo que es capaz de crecer hasta un metro, y luego desarrollar de 3 a 5 raíces laterales que forman

la horqueta; hojas grandes de color verde oscuro y flores de origen cauliflora, completas, hermafroditas y pentámeras. El fruto es una baya conocida como mazorca, que se sostiene de un pedúnculo fuerte y contiene semillas cubiertas por una pulpa blanca, mucilaginosa, de sabor dulce y ligeramente ácido.[6]

De acuerdo a las características de la mazorca, la flor y la semilla, hoy se identifican tres grandes grupos de cacao: criollo, forastero y trinitario.[14,15]

Figura 2. Características de los tipos de cacao: criollo, forastero y trinitario.

Tipo de cacao	Criollo	Forastero	Trinitario
Morfología de la mazorca			
Características	Presenta estaminoides grandes con colores desde violeta o marfil hasta blanco. Produce un grano muy aromático y suave. Susceptible a problemas fitosanitarios. Mazorcas verdes o rojas con 20 – 30 semillas. Alto contenido de grasa.	Estaminoides de tamaño pequeño, sabor amargo y color bastante pigmentado (púrpura) de los cotiledones. Mazorcas verdes con 30 o más semillas de color púrpura con astringencia y bajo contenido de grasa.	Híbrido entre el cacao criollo y forastero. Presenta características intermedias entre los dos tipos. Mazorcas con 30 o más semillas con color de cotiledones variable.
Subclases identificadas	Criollo mexicano, Lagarto, Cacao real y Criollo Colombiano.	Amelonado, Común, Nacional, Matina, Popular Amazónico, Africano.	Catongo, Djati Roenggo.

Figura 2 (continuación)

Zonas de cultivo	Indonesia, México, Nicaragua, Colombia, Guatemala, Madagascar, etc.	Alta Amazonía (Perú, Ecuador y Colombia), Baja Amazonía (Brasil, Guyanas y laderas del río Orinoco), oeste de África, y este de Asia.	México, Centroamérica, Trinidad, Colombia, Venezuela, África y sureste de Asia.
Índice de calidad	Muy alta	Media	Buena

FUENTE. Adaptado de PRODUMEDIOS: BOGOTÁ, Caracterización Fisicoquímica y Beneficio Del Grano de Cacao (Theobroma Cacao L.), 2005 y BHATTACHARJEE, R.; LAVA KUMAR, P. Cacao. In Technical Crops. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants; *Springer*, 2007; pp 127–142.

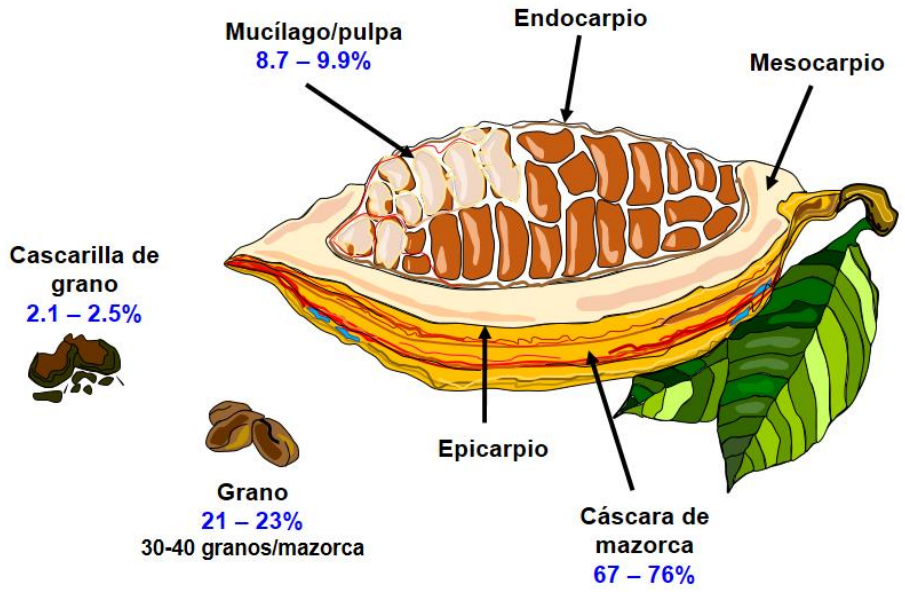
2.1.2 Características y composición del fruto de cacao. El fruto de la planta de cacao se puede describir como una baya, llamada generalmente mazorca, que posee de 10 a 35 cm de longitud y un peso promedio de 0,2 y 1 kg. Estas mazorcas de cacao se desarrollan completamente a partir de flores polinizadas después de 5 o 6 meses, también, debido al carácter laminar de estas mazorcas, se pueden distinguir 3 distintas capas: el epicarpio, el mesocarpio y el endocarpio. El endocarpio es un tejido suave y blanco que protege a los granos de cacao en una cámara interna bien lubricada; el mesocarpio es un composito duro que mantiene a los granos en su lugar y no permite que éstos sean movidos incluso si la mazorca se somete a altos impactos, y el epicarpio es la capa más externa, generalmente de color amarillo cuando está maduro el fruto (aunque también puede ser de otro color), y ésta es la que recibe toda la radiación solar y protege al fruto de factores climáticos o biológicos.

[14] PRODUMEDIOS: BOGOTÁ, Caracterización Fisicoquímica y Beneficio Del Grano de Cacao (Theobroma Cacao L.), 2005.
[15] BHATTACHARJEE, R.; LAVA KUMAR, P. Cacao. In Technical Crops. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants; *Springer*, 2007; pp 127–142.

Estas tres capas han sido analizadas según su composición química. El epicarpio se caracteriza por una alta cantidad de ceniza (10,1 %), hemicelulosa (17 %) y minerales (4,61 % de K, 0,58 % de Ca y 0,16 % de P), el mesocarpio posee un alto contenido de fibra cruda (29,5 %) y celulosa (57,5 %), y el endocarpio se caracteriza por altas cantidades de pectina (10,5 %) proteína (6,9 %) y grasas (1,1 %).

El contenido de humedad en la mazorca fresca y en las tres capas es mayor al 65%. El color de la mazorca de cacao es un factor muy variable, ya que estas tienden a ser de color verde, cuando el cacao es forastero, rojo, cuando el cacao es criollo, o variable, cuando el cacao es trinitario. El color de la mazorca se ubica en una muy externa y delgada capa (1 – 3 mm) en el epicarpio, y éste se relaciona con altos niveles de proantocianidinas solubles e insolubles.[8]

Figura 3. Estructura del fruto de cacao



FUENTE: Adaptado de CAMPOS-VEGA, Rocio.; NIETO-FIGUEROA, K. H.; OOMAH, B. D. Cocoa (Theobroma Cacao L.) Pod Husk: Renewable Source of Bioactive Compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 2018.

En la **Figura 3** se observan los distintos porcentajes de composición de las partes de la mazorca del cacao. Los granos o semillas de cacao, los cuales representan la fracción de mayor importancia debido a su uso y procesamiento para la elaboración de chocolate, sólo componen el 21 – 23 % del fruto completo, el 77 o 79 % restante queda como subproducto residual, por lo cual estos subproductos se podrían aprovechar y transformar para generar derivados de valor comercial. En la literatura se han reportado muchas investigaciones sobre la composición química de distintas partes del fruto de cacao, como la cáscara, la cáscarilla y el mucílago.

Tabla 1. Composición química de la cáscara, la cascarilla y del mucílago de cacao.

Componentes[a]	Cáscara de cacao	Cascarilla de cacao	Mucílago de cacao
Humedad	6,53 ± 0,13	7,11 ± 0,12	9,64 ± 0,17
Cenizas	8,42 ± 0,10	7,35 ± 0,15	7,51 ± 0,14
Proteína	4,21 ± 0,16	15,85 ± 0,17	5,47 ± 0,12
Grasa	2,34 ± 0,08	2,02 ± 0,03	1,92 ± 0,06
Carbohidratos	29,04 ± 0,18	1,8 ± 0,09	68,35 ± 0,16
Fibra dietaria soluble	4,12 ± 0,07	16,24 ± 0,04	16,11 ± 0,25
Fibra dietaria insoluble	51,98 ± 0,48	35,64 ± 0,20	0,78 ± 0,15
Fibra dietaria total	56,10 ± 0,13	51,88 ± 0,14	16,89 ± 0,18
Contenido fenólico (mg de ácido gálico/100 g de muestra)[b]	365,66	154,43	173,67

[a]Contenido en g/100 g de muestra seca. [b]Extracción con mezcla metanol:acetona

FUENTE: MARTÍNEZ ESPINOSA, Ruth, *et al*. Chemical, Technological and in Vitro Antioxidant Properties of Cocoa (Theobroma Cacao L.) Co-Products. *Food Res*. Int. 2012, vol 49, pp 39–45.

La **Tabla 1** muestra los componentes de cada una de las partes mencionadas. En ésta se observa que el mucílago sobresale en cuanto al porcentaje de humedad y contenido de carbohidratos; la cáscara de cacao no posee tantos carbohidratos como el mucílago, pero sí una cantidad moderadamente alta, además posee la

mayor cantidad de polifenoles; por su parte, la cascarilla del grano de cacao es abundante en proteína, fibra dietaria soluble y fibra dietaria total.[16]

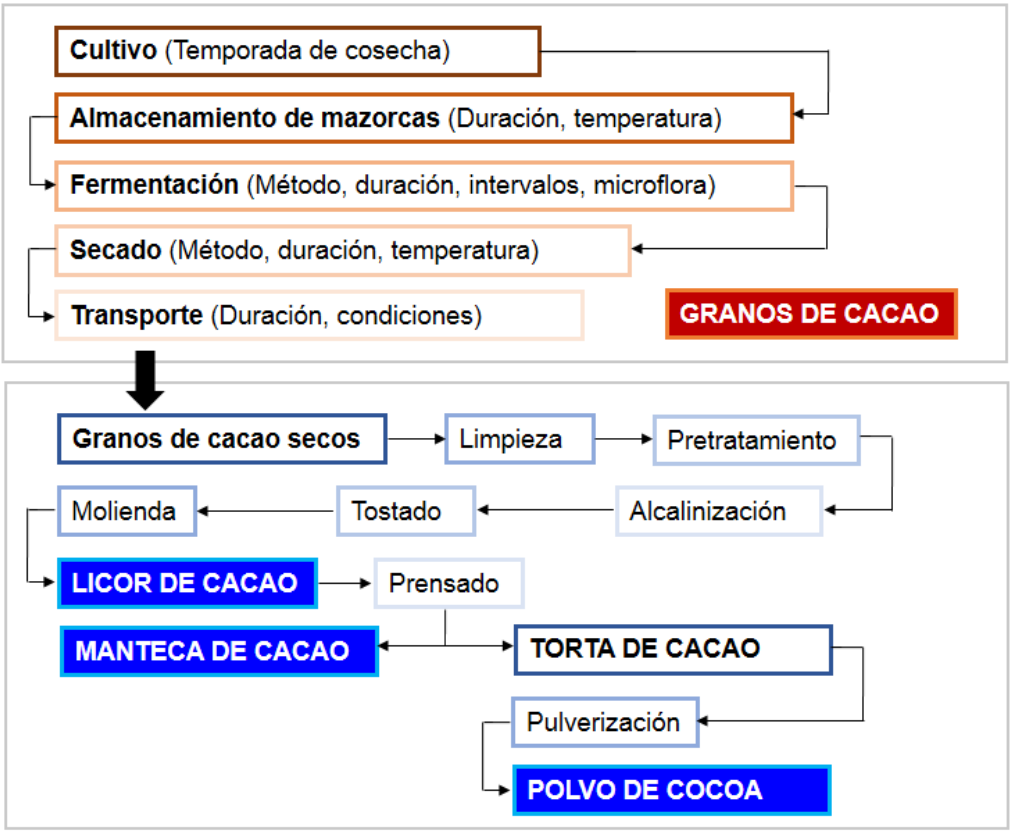
Además de estos componentes, se han identificado en el mucílago algunos minerales (K, Na, P, Ca, Mg), vitamina C, ácido cítrico, ácido málico, glucosa, fructosa y sacarosa. En la cáscara también se han identificado minerales (Ca, P, Mg, Fe, K, Mn), lignina, pectina, celulosa, hemicelulosa y teobromina; y en la cascarilla, otros de sus componentes importantes identificados han sido la teobromina y el ácido fítico.[4] En el caso de los granos de cacao, éstos se componen principalmente de grasa (>40 %), carbohidratos (>32 %) y proteínas (12 – 13 %). Contienen fibra en un rango de 11 – 19 %, y una cantidad de agua y ceniza menor al 6 %.[17] Los granos de cacao también se componen de compuestos pigmentos como los polifenoles (taninos, catequinas, antocianinas, leucoantocianinas) y de purinas (teobromina y cafeína).[6]

2.1.3 Aplicaciones del fruto de cacao. La principal industria beneficiada en el sistema de producción y transformación del fruto del cacao es la industria del chocolate y sus derivados. Este sistema de producción inicia con el cultivo de *Theobroma cacao* en el cual son importantes los factores de temperatura y pluviosidad, ya que su variación afecta directamente el crecimiento vegetativo, la emisión foliar, la intensidad de floración y los periodos de cosecha.[6] Después se recolectan los frutos maduros de cacao y se almacenan por un tiempo a una temperatura establecida. Una vez se transportan las mazorcas de cacao, éstas se parten por la mitad y se extraen los granos de cacao recubiertos de mucílago, los cuales son la materia prima de la industria de chocolate.

---

[16] MARTÍNEZ ESPINOSA, Ruth, *et al*. Chemical, Technological and in Vitro Antioxidant Properties of Cocoa (Theobroma Cacao L.) Co-Products. *Food Res*. Int. 2012, vol 49, pp 39–45.
[17] TORRES-MORENO, Miriam, *et al*. Nutritional Composition and Fatty Acids Profile in Cocoa Beans and Chocolates with Different Geographical Origin and Processing Conditions. *Food Chem.* 2014, vol 166, pp 125–132.

Figura 4. Producción de granos de cacao y procesos de manufactura



FUENTE: Adaptado de GIACOMETTI, Jasminka.; JOLIĆ, S.; JOSIC, D. Cocoa Processing and Impact on Composition. In *Processing and Impact on Active Components in Food*; 2015; pp 605–612.

La principal industria beneficiada en el sistema de producción y transformación del fruto del cacao es la industria del chocolate y sus derivados. Este sistema de producción inicia con el cultivo de *Theobroma cacao* en el cual son importantes los factores de temperatura y pluviosidad, ya que su variación afecta directamente el crecimiento vegetativo, la emisión foliar, la intensidad de floración y los periodos de cosecha.[6] Después se lleva a cabo la recolección de los frutos maduros de cacao y se almacenan por un tiempo a una temperatura establecida. Una vez se transportan las mazorcas de cacao, éstas se parten por la mitad y se extraen los granos de

cacao recubiertos de mucílago, los cuales son la materia prima de la industria de chocolate.

En el proceso de fermentación, los azúcares que componen el mucílago del cual están recubiertos los granos de cacao producen etanol y dióxido de carbono en una etapa anaeróbica, gracias a las enzimas de microorganismos involucrados; después, dos tipos de bacterias convierten el etanol en ácido acético y ácido láctico, favoreciendo dentro de los granos de cacao un cambio en la concentración de polifenoles y la síntesis de compuestos responsables del olor del chocolate. Seguidamente, se lleva a cabo el proceso de secado, el cual es de gran importancia para la obtención de granos de alta calidad, los granos se limpian y se alcalinizan para ajustar su pH, y se someten a procesos de tostado y molienda para obtener licor o pasta de cacao. La pasta de cacao se puede someter a un proceso de prensado, para obtener manteca de cacao y polvo de cocoa, de estas tres materias primas, se generan los distintos productos terminados de la industria chocolatera.[18]

A partir de algunos residuos del procesamiento de granos de cacao, se elaboran también productos de alto valor comercial. Por ejemplo, los exudados de pulpa de cacao se pueden convertir en bebidas frutales, jarabe o mermelada. Los jugos de pulpa de cacao fermentados son útiles para producir bebidas alcohólicas y vinagre. Por último, la manteca de cacao de granos descartados puede ser utilizada para producir jabones o pomadas corporales.

2.1.4 Producción y comercialización de cacao. En el mercado del cacao se han registrado muchas variaciones en los datos de producción mundial en los últimos 10 años. A partir del 2009, cuya producción fue de 3,56 millones de toneladas de cacao,[19] se inició una tendencia general de incremento en la producción mundial durante los años posteriores, y con excepción de las producciones estimadas en 2013 y 2016, que fueron por debajo de las 4 millones de toneladas, estos valores han ido subiendo hasta hoy, donde el reporte del 2019 fue de 4,78 millones, y el valor pronosticado para el 2020 es de 4,75 millones de toneladas.[20]

Al analizar los principales contribuyentes al sistema de producción mundial de cacao, se evidencia que la producción se concentra en un 76 % en África, un 16 % en América y un 8 % en Oceanía. Costa de marfil se encuentra posesionado como el primer productor del mundo, con 2,02 millones de toneladas, seguido por Ghana, con 900.000 toneladas, Indonesia, con 280.000, y Ecuador, con 270.000. Colombia ocupa el décimo lugar, con una producción de 59.000 toneladas, lo que lo convierte en un país considerablemente representativo en la producción latinoamericana y mundial.[21]

Desde el año 2011 se ha reportado un crecimiento progresivo en la producción nacional de cacao, que hasta 2017 alcanzó el máximo incremento con una tasa del 62 %, y que vale la pena destacar, se logró a pesar de las adversidades climáticas presentadas en el país en ese periodo. Para el año 2019 se reportó una producción de 59.740 toneladas de cacao, valor que hace parte de la línea de tendencia de crecimiento mencionada, En este sentido, los valores pronosticados aspiran a que estas cifras de producción continúen subiendo en los próximos años.[22]

---

[18] GIACOMETTI, Jasminka.; JOLIĆ, S.; JOSIC, D. Cocoa Processing and Impact on Composition. In *Processing and Impact on Active Components in Food*; 2015; pp 605–612

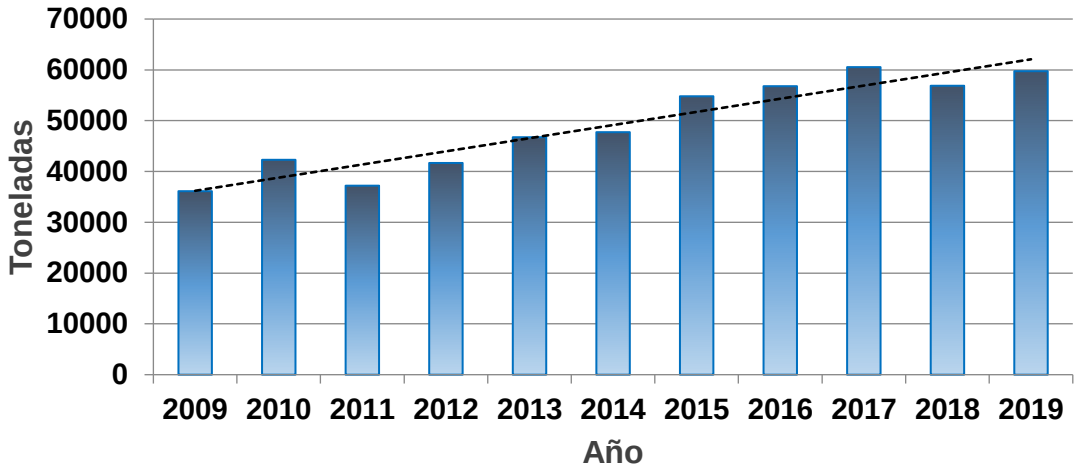
[19] INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICCO).Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, 2010.

[20] INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. (ICCO). May 2020 Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics; 2020.

[21] FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS FONDO DE ESTABILIZACIÓN DE PRECIOS DEL CACAO - FEP CACAO. Informe de Gestión Año 2017 Fondo de Estabilización de Precios Del Cacao – FEP CACAO; Bogotá, 2018.

[22] ECONOMÍA NACIONAL, [Consulta: 9 de septiembre, 2019]. Disponible en www.fedecacao.com

Figura 5. Producción de cacao en Colombia



FUENTE. Autor

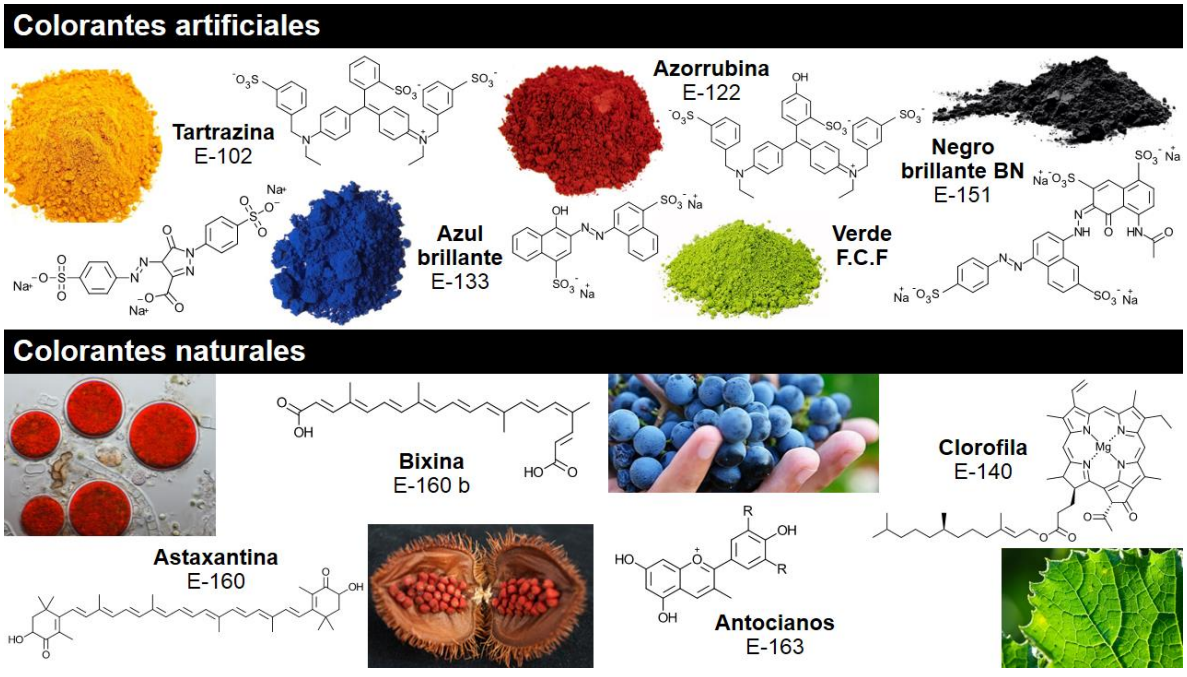
El panorama de exportaciones de cacao para Colombia, aunque ha sido bastante variado en los últimos años debido a precios de cotización internacional, se ha mantenido estable, y ha registrado una buena correlación con la producción nacional, donde los años en que aumentó la producción, lo hicieron también las exportaciones. Los principales países destino de exportación son: México, Holanda, Italia, España, Malasia, Bélgica y Estonia. Por otra parte, el índice de importaciones en el país disminuyó en un 92 % desde el 2011 hasta el 2017. Este es un aspecto positivo, ya que significa que las principales importadoras de cacao en Colombia han aumentado sus compras en el mercado nacional.

Continuando en el contexto nacional, el primer departamento productor de cacao en el país es Santander, con una producción de 23.574 toneladas anuales y una participación del 41.45 %, le siguen Antioquia, Arauca, Huila, Tolima, Nariño, Cesar, Meta, Cundinamarca y el resto de departamentos con una participación al 2 %.[22]

Las principales empresas en el mercado agroindustrial del cacao son: Compañía Nacional de Chocolates y Casa Luker, el restante está compuesto por aproximadamente 20 empresas medianas y 30 pequeñas. Los principales subproductos generados son: licor de cacao, manteca de cacao y torta, y como productos terminados se generan principalmente bombonería, coberturas, chocolate de mesa y chocolate artesanal.[23]

2.1.5 Uso de colorantes en la industria. El color de los alimentos es una característica importante al seleccionar productos de calidad, ya que éste nos permite indicar el grado de madurez y frescura del alimento o hace más llamativo un producto elaborado. A nivel industrial, se han empleado los colorantes (clasificados dentro de los aditivos alimentarios) para restaurar el color original de los alimentos, corregir variaciones naturales de color, intensificar el color propio de alimentos poco uniformes y otorgar a un alimento un color propio que lo identifique.

Figura 6. Ejemplos de colorantes artificiales y naturales



FUENTE: Autor

Los colorantes se pueden clasificar como: colorantes artificiales, aquellos que son elaborados por síntesis química y que no se encuentran por si mismos en la naturaleza, y colorantes naturales, aquellos que se logran aislar desde fuentes naturales como vegetales, minerales o animales.[24]

Como ejemplos de colorantes artificiales permitidos por el reglamento sanitario de alimentos se encuentran: Amarillo crepúsculo, tartrazina, azul brillante, indigotina, azorrubina, ponceau 4R, café HT, negro brillante BN, betacaroteno sintético, verde F.C.F y eritrosina. En general, los colorantes artificales son de bajo costo, múltiples presentaciones (polvo, pasta, granular, mezcla diluida, solución no acuosa, etc.) y abarcan su uso en todo tipo de alimentos. Por otra parte, los colorantes naturales (bixina, antocianos, astaxantina, betaína, carotenos, clorofila, carmín de cochinilla, carbón vegetal, cúrcuma, TiO_2, etc.), son utilizados de forma más específica en alimentos, pero casi todos cuentan con buenas prácticas de manufactura.[24]

Actualmente, muchos efectos adversos a la salud se han relacionado con el uso de colorantes artificiales. La mayoría de los colorantes mencionados, poseen características de: genotóxico, carcinogénico, inductor de reacciones alérgicas (urticaria, asma y rinitis), generador de conducta hiperactiva y atención dispersa en infantes, etc.[25] y ante el riesgo de afectar la salud pública, las industrias y los mercados internacionales se han interesado más ampliamente por formulaciones más naturales, libres de ingredientes sintéticos.[26]

---

[23] CONTRERAS, Carlos. Análisis de La Cadena de Valor Del Cacao En Colombia: Generación de Estrategias Tecnológicas En Operaciones de Cosecha y Poscosecha, Organizativas, de Capacidad Instalada y de Mercado, Universidad Nacional de Colombia, 2017.

[24] PARRA, Verónica. Estudio Comparativo En El Uso de Colorantes Naturales y Sintéticos En Alimentos, Desde El Punto de Vista Funcional y Toxicológico, Universidad Austral de Chile, 2004.

[25] BELMONTE, José.; ARROY, Ismael.; VAZQUEZ, Miguel. Synthetic Dyes in Food Stuff. *Rev. Nat. y Tecnol.* 2016, vol 10, pp 25–38.

[26] CARMONA, Iris. *De Colorantes Sintéticos a Naturales En La Industria Alimentaria*; Santiago de Chile, 2013.

Otra gran ventaja en el uso de colorantes naturales, citando por ejemplo las antocianinas, es que además de servir como colorantes alimentarios, poseen efectos favorables para la salud. Uno de ellos es su capacidad antioxidante, mediante la cual se atrapan radicales libres en nuestro organismo que inducen el estrés oxidativo. Las antocianinas también juegan un rol importante como agentes antidiabéticos, vasoprotectores e inhibidores de etapas carcinogénicas.[27]

En la **Tabla 2** se registran los principales colorantes naturales empleados en la industria de alimentos y su clasificación según su naturaleza química y color.[28,29]

Tabla 2. Colorantes y pigmentos empleados en la industria de alimentos.

Clasificación Química	Aditivo	Fuente	Color	Uso	Número E
Antocianina	Extracto de piel de uvas	Prensado de cáscara de uva	Rojo a morado a azul	Comidas y bebidas	E163
	Extracto coloreado de uvas	Uvas Concord (*Vitis labrusca*)		No-bebidas	
	Jugo de fruta	Frutos rojos		General	
	Jugo vegetal	Zanahoria, repollo y otros		General	
Betalaína	Extracto de remolacha	Remolacha (*Beta vulgaris*)	Rosado a rojo	General	E162
Caramelo	Caramelo	Azúcar fundido	Marrón	General	E150
Ácido carmínico	Extracto de cochinilla	*Dactylopius coccus*	Naranja a rojo	General	E120
Carotenoide	Anatto	Bixa Orellana L.	Amarillo a naranja a rojo	General	E160b
	Astaxantina	Sintetizado, bacterias (*Paracoccus carotinifaciens*), algas (*Haematococcua pluvialis*)		Alimento para pescado	---
	β-caroteno	Natural (zanahorias) o sintetizado		General	E160a

Tabla 2 (continuación)

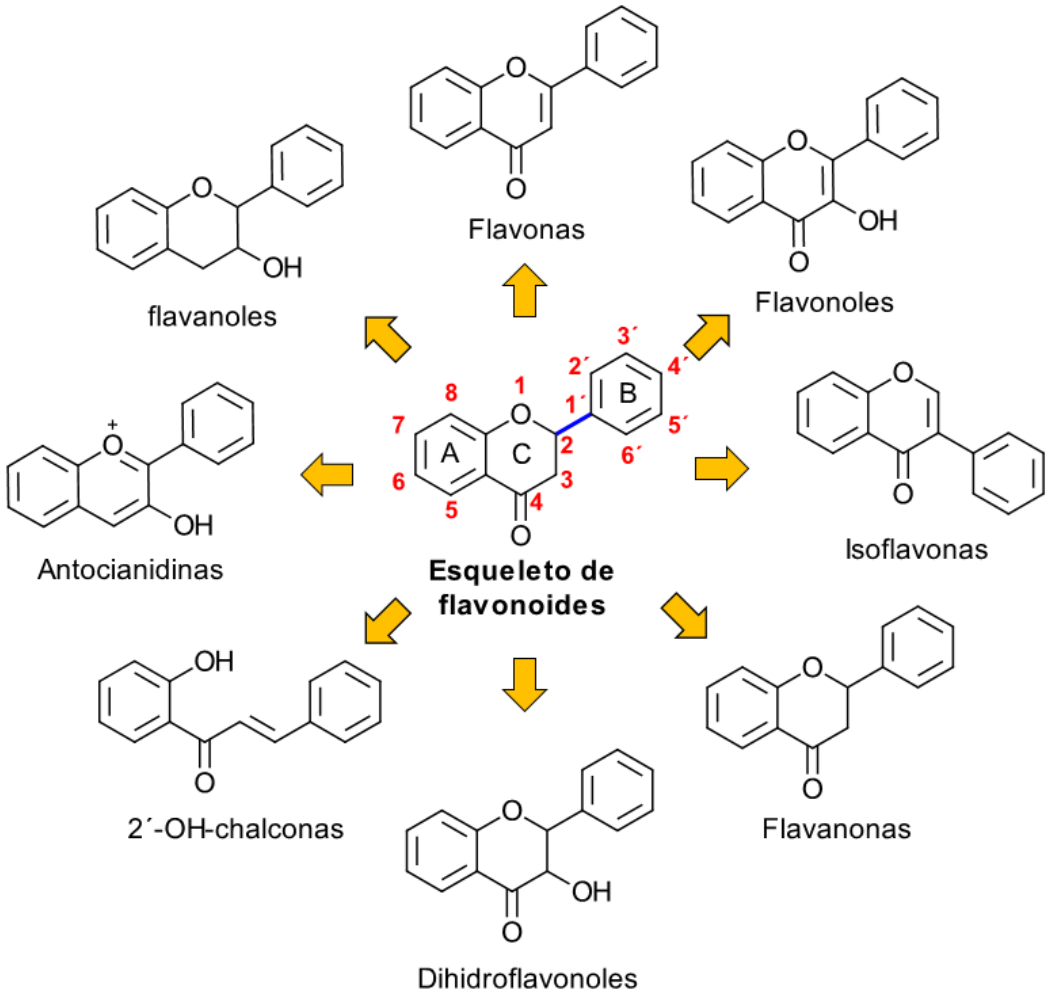
Carotenoide	Aceite de zanahoria	Zanahoria (*Daucus carota L.)*	Amarillo a naranja a rojo	General	---
	Paprika (Oleoresina)	Paprika (*Capsicum annum L.)*		General	E160c
	Azafrán	Estigma (*Cocrus sativus L.*)		General	---
	Tagetes	Caléndula azteca (*Tagetes erecta L.*)		Alimento para pollos	---
	Licopeno de tomate	Tomate (*Solanum lycopersicum*)		General	E160d
Clorofila	Clorofilina de cobre sódico	Alfalfa (*Medicago sativa*)	Verde	Mezclas de bebidas basadas en cítricos	E141
Curcuminoide	Cúrcuma (oleoresina)	*Curcuma longa L.*	Amarillo	General	E100
Mineral	Óxido de hierro	Sintetizado	Amarillo a naranja a rojo a marrón a negro	Confitería	E172
	Mica	Sintetizado	Nacarado	General	---
	Óxido de titanio	Sintetizado	Blanco	General	E171

FUENTE: Adapatado de DOWNHAM, Alison.; COLLINS, Paul. Coloring Our Foods in the Last and next Millenium. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2000, vol 35, pp 5–22 y SIGURDSON, Gregory.; TANG, Peipei.; GIUSTI, M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2017, vol 8.

[27] ZAPATA, Luz. Obtención de Extracto de Antocianinas a Partir de Arándanos Para Ser Utilizado Como Antioxidante y Colorante En La Industria Alimentaria, Universidad Politécnica de Valencia, 2014.
[28] DOWNHAM, Alison.; COLLINS, Paul. Coloring Our Foods in the Last and next Millenium. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2000, vol 35, pp 5–22.
[29] SIGURDSON, Gregory.; TANG, Peipei.; GIUSTI, M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2017, vol 8.

2.1.6 Flavonoides. Los flavonoides son moléculas polifenólicas de bajo peso molecular que presentan un gran interés en el campo sintético, médico y alimenticio. Éstos se caracterizan por poseer un esqueleto básico de 15 átomos de carbono, arreglados en la forma C6 – C3 – C6, el cual corresponde a dos anillos aromáticos A y B unidos mediante 3 átomos de carbono que forman generalmente un anillo C. De acuerdo con la IUPAC, estos compuestos se pueden clasificar en: flavonoides (derivados de la 2-fenilcromen-4-ona), isoflavonoides (derivados de la 3-fenilcromen-4-ona) y neoflavonoides (derivados de la 4-fenilcumarina).[30]

Figura 7. Estructura y principales tipos de flavonoides



FUENTE: Adaptado de COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects and Dietary Sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996, vol 7, pp 66–76.

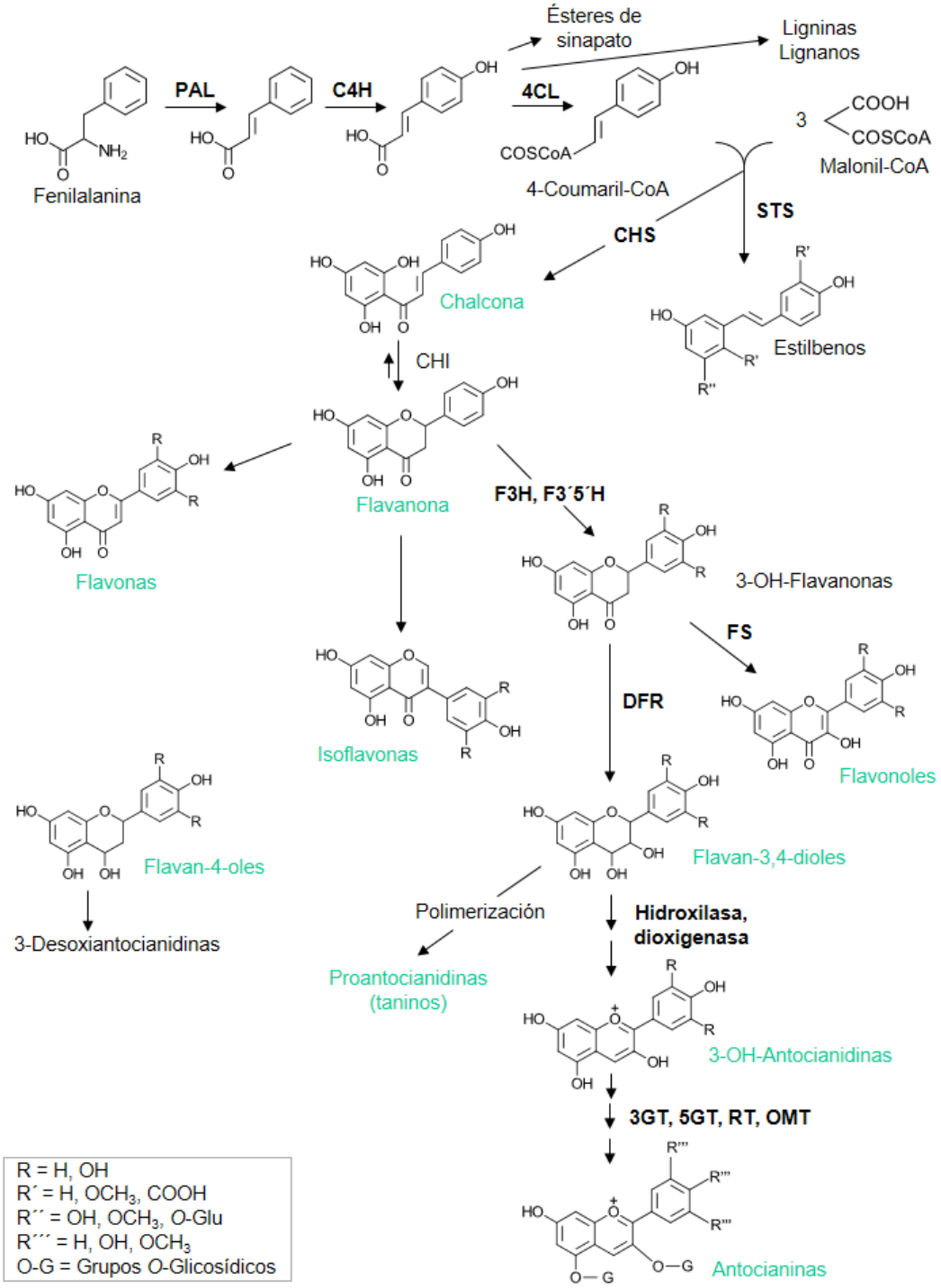
Cerca de 10.000 tipos de flavonoides han sido identificados en plantas, convirtiéndose en el tercer grupo mayoritario de metabolitos secundarios encontrados después de los terpenoides (30.000) y los alcaloides (12.000).[31] La importancia de la producción de estos metabolitos en el reino vegetal se relaciona con su efecto protector ante ataques por parásitos fúngicos, herbívoros y patógenos, y contra el estrés oxidativo celular. Los distintos tipos de flavonoides y sus derivados, juegan un papel importante en la dieta humana y animal, y su consumo regular se relaciona con un amplio rango de propiedades biológicas y farmacológicas, tales como: antioxidante, citotóxica, anticancerígena, antibacterial, antiviral, antiinflamatorio, antialérgica, antitrombótica, cardioprotectiva, hepatoprotectiva, neuroprotectiva, antimalárica y antiamébica.[31,32]

La biosíntesis de los flavonoides en las plantas inicia con la fenilalanina, la cual es convertida catalíticamente en ácido cinámico, después transformada en ácido *p*-cumarínico y seguidamente transformada en 4-cumaril-CoA. El 4-cumaril-CoA puede condensarse con 3 moléculas de malonil-CoA para dar una chalcona (2´,4´,6´,4-tetrahidroxichalcona). Subsecuentemente esta chalcona es isomerizada a una flavanona, y a partir de estos dos intermedios centrales pueden divergir varias rutas enzimáticas que conducen a la formación de los distintos tipos de flavonoides.[13]

---

[30] IUPAC. COMPENDIUM OF CHEMICAL TERMINOLOGY, Ed 2.; McNaught, A. D., Wilkinson, A., Eds.; Blackwell Scientific Publications, 1997.
[31] SANTOS, Erica, *et al*. Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology; 2017.
[32] COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects and Dietary Sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996, vol 7, pp 66–76.

Figura 8. Biosíntesis de flavonoides



FUENTE: Adaptado de COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects and Dietary Sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996, vol 7, pp 66–76.

La **Figura 8** muestra el esquema biosintético de los flavonoides empleando la ruta de los fenilpropanoides. Las enzimas que catalizan las reacciones presentadas son: PAL, Fenilalanina amonioliasa; C4H, Cinamato 4-hidroxilasa; 4CL, 4-Coumaril-CoA ligasa; CHS, Chalcona sintasa; STS, Estilbeno sintasa; CHI, Chalcona isomerasa: F3H, Flavanona 3-hidroxilasa; F3´5´H, Flavanoide 3´5´-hidroxilasa; FS, Flavonol sintasa, DFR, Dihidroflavonol reductasa; 3GT, 3-Glucosil transferasa; 5GT, 5-Glucosil transferasa; RT, Ramnsoil transferasa; OMT, *O*-metil transferasa.[33,34]

Una propiedad importante de los flavonoides es su capacidad para secuestrar radicales libres, razón por la cual se les considera antioxidantes naturales. Para desarrollar tal capacidad antioxidante, los flavonoides deben presentar tres características estructurales importantes: (1) una estructura de 3´,4´-dihidroxi-(catecol) en el anillo B que favorezca la deslocalización electrónica, (2) un enlace insaturado 2-3 conjugado con el grupo 4-ceto y (3) grupos –OH en las posiciones 3 y 5 que formen puentes de hidrógeno intramolecular con el grupo 4-ceto.

2.2 ANTECEDENTES

Barazarte *et al* (2008) publicaron un trabajo sobre extracción de pectina desde cáscara de cacao para su posible aplicación en la industria alimentaria. Las metodologías de extracción las desarrollaron variando el pH y la temperatura en soluciones de EDTA al 5%; a su vez, midieron como variables de respuesta para las pectinas: rendimiento, contenido de ácido anhidrogalacturónico, contenido de metoxilos, grado de esterificación y peso equivalente. Como experimento piloto, elaboraron una mermelada empleando la pectina extraída, logrando una mermelada con un agrado moderadamente bueno.[35]

---

[33] WINKEL-SHIRLEY, Brenda. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol.* 2001, vol 126, nro 2, p 485.
[34] WINKEL-SHIRLEY, Brenda. Flavonoid Biosynthesis: 'New' Functions for an 'Old' Pathway. *Trends Plant Sci.* 1996, vol 1, nro 11, pp 377–382.
[35] BARAZARTE, H.; SANGRONIS, E.; UNAI, E. Cocoa (Theobroma Cacao L.) Hulls: A Posible Commercial Source of Pectins. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2008, vol 58, nro 1, pp 64–70.

Ardila y Carreño (2011) reportaron el uso de cáscara de cacao como adsorbente. En su trabajo experimental, modificaron químicamente la superficie de la cáscara de la mazorca de cacao mediante un tratamiento térmico, redujeron el tamaño de partícula, y probaron su capacidad de adsorción en soluciones de azul de metileno, y de sales de hierro, cromo y níquel, logrando remociones desde un 43% hasta un 99% de los adsorbatos.[36]

Kumi *et al* (2012) publicaron un manual sobre la extracción de potasio desde cáscaras de cacao para la elaboración de jabón suave. Esta práctica de elaboración de jabón suave (conocido como *alata samina*) de forma artesanal se ha desarrollado por mucho tiempo en Ghana. El proceso de extracción consiste en: primero, secar las cáscaras de las mazorcas de cacao residual, segundo, quemar las cáscaras de cacao secas para obtener cenizas, tercero, lixiviar las cenizas obtenidas agregando agua para solubilizar las sales de potasio y generar un filtrado, y, por último, concentrar las sales de potasio por evaporación o ebullición. La elaboración de los jabones combinaba las sales de potasio obtenidas con algún tipo de aceite.[10]

Figura 9. Elaboración de jabón a partir de cáscaras de cacao

FUENTE: ARDILA, Carolina.; CARREÑO, Silvia. Aprovechamiento de La Cáscara de La Mazorca de Cacao Como Adsorbente, Trabajo de grado, Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander, 2011

Mansur et al (2014) registraron en la literatura la pirólisis de cáscaras de mazorca de cacao y una subsecuente reacción catalítica como alternativa de aprovechamiento biotecnológico para este subproducto residual. Dos extractos, uno acuoso y uno oleico, obtenidos de la pirólisis de las cáscaras de cacao fueron inicialmente analizados por GCMS, logrando identificar sus componentes. Posteriormente, la fase acuosa se sometió a reacciones catalíticas con catalizadores de ZrO_2 – obteniendo reactivos químicos de utilidad industrial y sintética: acetona, 2-butanona, fenol, cresol, xileno y etilfenol.[11]

Laconi y Jayanegara (2015) publicaron el mejoramiento de la calidad nutricional de las cáscaras de cacao como comida para rumiantes mediante tratamientos químicos y biológicos. En el estudio, se tomó cáscara de cacao en polvo como control, y se hicieron formulaciones de cáscara en polvo con: úrea, melaza, contenido ruminal y melaza + inóculo de *Phanerochaete chrysosporium*. Todas las formulaciones lograron disminuir significativamente el contenido de lignina en el polvo de cáscara de cacao. Por otra parte, el promedio de ganancia diaria de los novillos a los que se les dieron las formulaciones con úrea y con *P. chrysosporium* fue del 105 % y del 92 %, respectivamente.[9]

Lateef et al (2016) reportaron una investigación en la cual emplean extracto de cáscaras de cacao para sintetizar nanopartículas de plata (AgNPs). Para la biosíntesis de las nanopartículas, primero obtuvieron un extracto acuoso de la cáscara de cacao con metodologías muy sencillas (calentamiento a 60 °C/1h, filtración y centrifugación), después sintetizaron las AgNPs según su protocolo y evaluaron propiedades biológicas, mostrando una alta efectividad como: agentes antimicrobianos contra aislados clínicos resistentes a multidrogas (*Klebsiella pneumonia* y *Escherichia coli*), agentes antioxidantes empleando la prueba de barrido del radical *DPPH*, y como agentes larvicidas contra la larva del mosquito *Anopheles*.[37]

Betiku et al (2017) publicaron un estudio sobre el uso de cenizas calcinadas de cáscara de cacao como catalizadores para la transesterificación de aceite de semillas de Neem (Azadirachta indica) en biodiesel. Los autores explican que la acción catalítica de las cenizas calcinadas de la cáscara se debe a su alto contenido de potasio y a su desarrollo microestructural, cuando se lleva la calcinación a 700 °C por 4 horas.[38]

Batista et al (2018) publicaron en su trabajo la producción de xilitol, un azúcar de uso alimenticio, a partir de hemicelulosa hidrolizada de cáscara de cacao (siglas en inglés CPHHH). Inicialmente realizaron un diseño experimental para la hidrólisis ácida de la cáscara de cacao con ácido sulfúrico, después, realizaron los procedimientos de fermentación con células de levadura *Candida boidinni XM026*, uno con CPHHH sin desintoxicar, y el otro con CPHHH desintoxicada por ajuste de pH y adsorción de carbón activado. Los resultados mostraron una obtención de xilitol de 11,34g/L con una eficiencia de fermentación del 56.6 %. Además, la levadura fue tolerante a compuestos inhibidores y fenólicos, y fue capaz de metabolizar más del 99% del furfural y el hidroximetilfurfural de la CPHHH no desintoxicada, mostrando así la efectividad de producción de xilitol por este microorganismo.[39]

---

[36] ARDILA, Carolina.; CARREÑO, Silvia. Aprovechamiento de La Cáscara de La Mazorca de Cacao Como Adsorbente, Trabajo de grado, Ingeniería Química, Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander, 2011.

[37] LATEEF, Agbaje, *et al*. Cocoa Pod Husk Extract-Mediated Biosynthesis of Silver Nanoparticles: Its Antimicrobial, Antioxidant and Larvicidal Activities. *J. Nanostructure Chem.* **2016**, *6*, 159–169.

[38] BETIKU, Eriola, *et al*. Two-Step Conversion of Neem (Azadirachta Indica) Seed Oil into Fatty Methyl Esters Using a Heterogeneous Biomass-Based Catalyst: An Example of Cocoa Pod Husk. *Energy & Fuels*, 2017, vol 31.

[39] Santana, N. B.; Dias, J. C. T.; Rezende, R. P.; Franco, M.; Oliveira, L. K. S.; Souza, L. O. Production of Xylitol and Bio-Detoxification of Cocoa Pod Husk Hemicellulose Hydrolysate by Candida Boidinii XM02G. *PLoS One* 2018, vol 1, nro 4.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES Y REACTIVOS

En la **Tabla 3** se reportan los reactivos y equipos empleados durante la investigación con sus respectivas especificaciones.

Tabla 3. Reactivos y equipos empleados durante la investigación

Reactivos y disolventes	**Especificaciones**
Etanol	Pureza: 99.8 %, *Mallinckrodt Baker Inc.* (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.)
Tetrahidrofurano, THF	Pureza: 99 %, *Mallinckrodt Baker Inc.* (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, EE.UU.)
Ácido clorhídrico 37 %, HCl	Pureza: 99 %, *Merck* (Darmstadt, Alemania)
Dimetilsulfóxido, DMSO	Pureza: 99 %, *Merck* (Darmstadt, Alemania)
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, MTT	Pureza: 99 %, *Merck* (Darmstadt, Alemania)
Equipos de laboratorio	
Balanza Analítica	Mettler Toledo AL204 (Nänicon, Suiza)
Molino de bolas	*Joy* (Alemania)
Máquina de tamiz vibratorio	*Restch GmbH*, Alemania
Tamices estándar para ensayo	Malla No 60, abertura de 250 µm, Pinzuar Ltda (Bogotá D.C. - Colombia)
Baño de ultrasonido	Elmasonic E30H (Elma, Alemania)
Rotoevaporador	Modelo *Advantage* (Schwabach, Alemania)
Espectrofotómetro UV-Vis	Genesys 10S de doble haz, con lámpara flash de Xenon, detector de fotodiodos duales de silicio y celda de cuarzo de 1 cm, *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, MA, EE.UU)
Espectrofotómetro UV-Vis	Modelo 2600 Shimadzu (Kyoto, Japón) con esfera de integración

FUENTE: Autor

3.2 TRATAMIENTO Y LIOFILIZACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE CACAO

Las mazorcas de cacao fueron obtenidas del *spin-off* Nextcoa (Santander - Colombia), clon CCN-51. Inicialmente, las mazorcas fueran limpiadas en su exterior (cáscara) para eliminar contaminantes, se cortaron tiras de epicarpio de cáscaras

de cacao (ECC) y se depositaron en agua con hielo a 10 °C para evitar la oxidación enzimática. Seguidamente, estas tiras fueron congeladas y liofilizadas para garantizar la mínima humedad dentro la muestra, y luego fueron molidas y tamizadas obteniendo un tamaño de partícula <250 µm. El polvo de las tiras liofilizadas de ECC fue almacenado a temperatura ambiente dentro un frasco ámbar y purgando la muestra con gas argón. Esta metodología se desarrolló para tres colores de ECC (amarillo, rojo y vino tinto).

3.3 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

Con el fin de obtener fracciones orgánicas ricas en flavonoides, responsables del color de los ECC, se seleccionó la extracción con disolventes polares asistida con ultrasonido, tal como se recomienda en la literatura.[13,40] A su vez, para determinar las condiciones óptimas de extracción de estas fracciones de interés, se desarrolló un diseño experimental 2^3 con 2 niveles de estudio, 4 réplicas en el centro y 3 variables: relación EtOH/H_2O, porcentaje de ácido clorhídrico (HCl) y temperatura de extracción. Como variable de respuesta (observable) se tomó la absorbancia medida a una longitud de onda λ=283 nm (longitud de onda de mayor intensidad de los espectros UV-Vis de flavonoides). Los niveles y variables de estudio fueron seleccionados con base en extracciones análogas en cascarilla de cacao.[41]

Tabla 4. Variables y niveles evaluados en el diseño experimental

Variable	Niveles		
	Bajo (-1)	**Medio (0)**	**Alto (1)**
X1:Relación EtOH:H_2O, v/v	50:50	65:35	80:20
X2:HCl, %	0	0,5	1
X3:Temperatura, °C	30	40	50

FUENTE: Autor

[40] HERRERA, M. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-Assisted Extraction for the Analysis of Phenolic Compounds in Strawberries. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, vol 379, nro 7–8, pp 1106–1112.
[41] YUSOF, A, *et al*. Optimization of an Ultrasound-Assisted Extraction Condition for Flavonoid Compounds from Cocoa Shells (Theobroma Cacao) Using Response Surface Methodology. *Molecules* vol 24, nro 4.

La metodología de cada experimento consistió en pesar 1g de muestra (polvo de tiras liofilizadas de ECC amarillo), este se agregó a un vial junto con 20 mL de la respectiva mezcla EtOH/H_2O, se adicionó la cantidad requerida de HCl según el experimento y se sumergió cada vial en un baño de ultrasonido a la temperatura asignada. Después se filtró cada vial con papel franja negra, y el filtrado fue rotoevaporado y liofilizado para eliminar disolventes. Los extractos de epicarpio de cáscara de cacao (EECC) amarillos fueron almacenados en frascos ámbar a 4 °C.

La caracterización de los EECC amarillos por espectroscopia UV-Vis se realizó preparando soluciones de 1 mg de extracto/3 mL de MeOH y empleando una celda de cuarzo de camino óptico de 1 cm.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de extracción, estas se aplicaron para obtener los tres EECC coloreados (amarillo, rojo y vino tinto) que fueron empleados en el resto de procedimientos metodológicos.

Tabla 5. Condiciones establecidas para la obtención de los extractos de epicarpio de cáscara de cacao (EECC)

N°	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

FUENTE: Autor

3.4 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

El contenido de polifenoles totales sé determinó empleando el método de Folin-Ciocalteu. Para esto se tomaron 150 µL de EECC y se mezclaron con 600 µL de agua destilada, 1,5 mL de solución de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 7 % m/v y 150 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, en ese orden específico. Después, la mezcla de reacción fue incubada a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 hora, y fue medida la absorbancia de la solución a 760 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los EECC (amarillo, rojo y vino tinto). Por otra parte, se construyó una curva de calibración de ácido gálico con cuatro puntos: 0,01, 0,04, 0,08 y 0,4 mg/mL. Cada una de las soluciones de ácido gálico fue sometida a la misma metodología empleada con los EECC para poder medir la absorbancia a 760 nm.[16]

3.5 IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN LOS EECC EMPLEANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

Todos los experimentos LDI y MALDI se llevaron a cabo empleando un espectrómetro de masas MALDI TOF-TOF *Bruker Ultraflextreme* (Bruker Daltonics, Billerica, MA), equipado con un láser *Smart Bean* de Nd:YAG (λ=355 nm) con frecuencia de 1 kHz, una salida máxima de energía de 85 µJ por disparo y un pulso de 6 ns con ancho de *spot* entre 10 µm y 100 µm. En general, los espectros de masas se adquirieron en el rango de m/z 100 a 1000 en modo positivo/ión reflectrón usando un voltaje de aceleración de 25 kV, con extracción pulsada de iones (PIE) de 100 ns y una resolución de rango de potencia desde 5.000 hasta 30.000. La calibración del equipo en el rango de masas especificado se realizó usando la serie de péptidos estándar: leucina-encefalina, bradiquinina, bombesina y sustrato de renina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO).

La preparación de la muestra se realizó con soluciones de las matrices (DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3) 5mM en THF. Las mezclas fueron agitadas para disolver los compuestos. Soluciones de los tres EECC (amarillo, rojo y vino tinto) en agua tipo I fueron preparadas y sembradas en un target inoxidable MALDI y después

se sembraron encima de estas las soluciones de las matrices. Se calculó una relación molar analito:matriz (A:M) 1:1000 y se dejaron secar a temperatura ambiente las mezclas sembradas para proceder con las mediciones. A partir de los espectros de masas, en los cuales se relaciona la abundancia de iones con la relación masa/carga, y a partir de bases de datos de flavonoides y polifenoles, fueron identificados los flavonoides presentes en los EECC.

3.6 EVALUACIÓN DE PROPIEDADES COLORANTES

Para analizar la capacidad colorante de los EECC obtenidos, se realizaron pruebas de impregnación sobre celulosa bacteriana (CB) obtenida de la cepa *Gluconacetobacter xylinus* y sobre muestras de yogurt. En primer lugar, se cortaron 250 g de CB en cubos y se sumergieron en 500 mL de solución (1,68 % v/v de ácido acético y 0,5 % v/v de ácido peroxiacético) durante 1 día para limpiar los cubos de CB, después se lavaron con agua destilada. Posteriormente, se prepararon soluciones de los tres EECC (amarillo, rojo y vino tinto) a una concentración de 30 mg/mL de agua y se mezclaron junto con los cubos de celulosa CB en una proporción de 1,4 g de CB/mL de agua, almacenando las mezclas a 4 °C. Se determinó la cinética de coloración midiendo por espectroscopía UV-Vis la absorbancia de las soluciones de EECC en determinados tiempos durante el intervalo de 5 días, y también se determinó la cinética de decoloración midiendo la absorbancia de mezclas de agua con cubos de celulosa ya impregnados durante 5 días también. A su vez, se realizaron ensayos de impregnación de las soluciones de EECC sobre los cubos de CB a presión atmosférica y al vacío, el cual fue generado mediante una máquina de sellado al vacío.

Por otra parte, se prepararon soluciones de los tres EECC en muestras de yogurt a una concentración de 10 mg de EECC/mL de yogurt y se almacenaron a 4 °C. Durante 5 días se monitoreó por espectroscopía UV-Vis la absorbancia de las soluciones para estudiar la estabilidad del color con el tiempo.

Se realizaron medidas de reflectancia difusa utilizando un espectrofotómetro UV-Vis 2600 marca Shimadzu (Kyoto, Japón) equipado con una esfera de integración. Para ajustar el 100 % de reflectancia se empleó como referencia sulfato de bario ($BaSO_4$). Se utilizó 1 g de polvo de cada uno de los EECC para la medición.

3.7 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Para evaluar las propiedades citotóxicas de los EECC se empleó el ensayo MTT, el cual se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.[42,43] Para ello se empleó la línea celular *Vero* (células normales epiteliales de riñon de mono verde africano), cultivadas en un medio EMEM (Eagle´s Minimun Essential Medium) con 7 % de suero fetal bovino a un pH de 7,4 y gentamicina [80 mg/mL]. Para separar las células de las cajas de cultivo se empleó una solución de tripsina-EDTA. Las células se dispusieron sobre una placa de 96 pozos (7500 células/pozo) y fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 % durante 24 h para garantizar total adherencia sobre la placa. Posteriormente, las células en condiciones metabólicas óptimas, fueron tratadas con soluciones de EECC disueltos en medio EMEM a una concentración de 300 µg/mL.

Para determinar la viabilidad celular, se agregaron 200 µL de MTT (500 µg/mL en tampón fosfato salino) y se incubaron durante 3 h. Después, se retiró la solución de MTT y se adicionaron 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales formados. La lectura de absorbancia se realizó en un lector de microplaca *MultiSkan Go-Thermo* a 570 nm. Las células viables y metabólicamente activas reducen la sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) formando cristales de formazan solubles en DMSO.

---

[42] GERLIER, Denis.; THOMASSET, Nicole. Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation. *J. Immunol. Methods* 1986, vol 94, nro 1, pp 57–63.
[43] RISS, Terry.; NILES, Andrews.; MINOR, Lisa. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. *Assay Guid. Man.* 2004, pp 1–23.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 TRATAMIENTO Y LIOFILIZACIÓN DE LAS CÁSCARAS DE CACAO

El aspecto más relevante en el tratamiento inicial de las cáscaras de cacao como material vegetal, es evitar la degradación enzimática de polifenoles y otros compuestos de interés que estén presentes en la muestra. La enzima Polifenol oxidasa (PO), es conocida por generar el mayor efecto de deterioro enzimático, ya que al cortar, rebanar o despulpar el material vegetal en presencia de oxígeno y en condiciones ácidas (rango de pH 5.4 - 6.4),[44] se aceleran los procesos de oxidación y degradación de polifenoles y sus derivados, formándose pigmentos marrones que indican dichos procesos. Existen reportes de varias estrategias de inactivación de PO como: reacción con enzimas, agentes reductores, cambios de pH e incremento de la temperatura.[45] Sin embargo, esta última estrategia podría afectar la estructura de los flavonoides al considerarse moléculas termolábiles, por ello, empleamos el enfriamiento a 10 °C de las tiras de epicarpio de cáscara de cacao (ECC) mediante el cual se ralentizó la actividad enzimática de la PO durante el proceso de corte.

En la **Tabla 6**, se muestran imágenes de las tiras liofilizadas de ECC observando que conservan su color en gran medida, y también se muestran los porcentajes de humedad y de composición porcentual del epicarpio con respecto al fruto de cacao.

Tabla 6. Características de las cáscaras de cacao liofilizadas

Propiedad	ECC Amarillo	ECC Rojo	ECC Vino tinto
Material liofilizado			
% humedad	84,18 %	83,33 %	80,47 %
Composición respecto al fruto de cacao	9,75 %	9,44 %	10,37 %

FUENTE: Autor

4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES

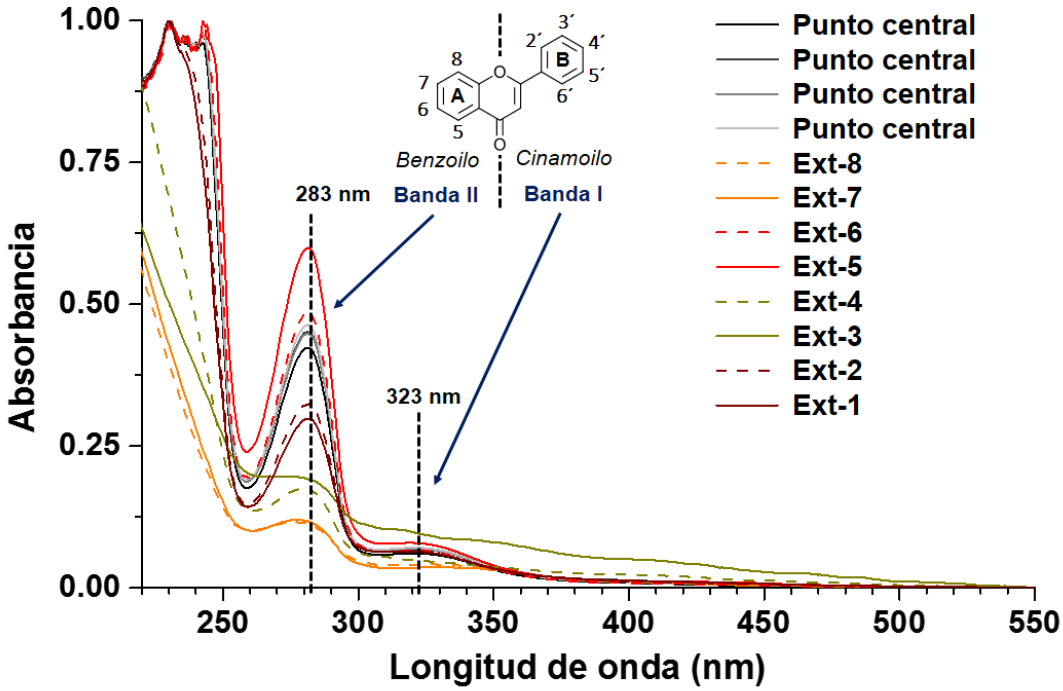
La estructura química de los flavonoides es bastante variada debido a patrones de hidroxilación, conjugación entre anillos aromáticos, residuos glicosídicos y sustitución por grupos metoxilos. La conjugación de sus dobles enlaces y la donación electrónica por parte de grupos –OH y otros sustituyentes, permiten las transiciones electrónicas que generan las bandas de absorción observadas en los espectros UV-Vis. En general, se logran identificar en los flavonoides dos máximos de absorción importantes: La banda II (240-285 nm) que corresponde al sistema benzoilo formado por el anillo A y el grupo 4-ceto, y la banda I (300-400 nm) que corresponde al grupo cinamoilo que incluye el anillo B y el grupo 4-ceto. La unión de grupos funcionales al esqueleto de los flavonoides ocasionan desplazamientos (batocrómicos e hipsocrómicos) en los espectros.[31,46]

Como se observa en la **Figura 10**, se lograron identificar en los espectros UV-Vis de los EECC amarillos las dos bandas descritas anteriormente, indicando la presencia de flavonoides dentro de estos extractos obtenidos por el diseño experimental. La banda I (323 nm) se registra a mayores $\lambda_{máx}$ debido a que el sistema π conjugado del grupo cinamoilo es más largo que el del grupo benzoilo, por otra parte, la banda ubicada en 283 nm es la de mayor intensidad, esto le permite tener mayor sensibilidad y por esta razón, se seleccionó como variable de respuesta en el diseño factorial. El diseño experimental 2^3 se llevó a cabo empleando tres variables, dos niveles para cada variable y cuatro réplicas en el centro, tal como se describió anteriormente. En la **Tabla 7** se muestran las condiciones de cada experimento y sus respectivas absorbancias a 283 nm.

---

[44] CHEEMA, Summervir.; SOMMERHALTER, Monika. Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Ataulfo Mango. *Food Chem.* 2015, vol 171, pp 382–387.
[45] TORO-URIBE, Said, *et al.* Insight of Polyphenol Oxidase Enzyme Inhibition and Total Polyphenol Recovery from Cocoa Beans. *Antioxidants* 2020, vol 9, nro 6, p 458.
[46] MARKHAM KEN. R.and MABRY, Tom. J. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. *Springer US*: Boston, MA, 1975; pp 45–77.

Figura 10. Espectros UV-Vis de los EECC amarillos obtenidos por el diseño experimental



FUENTE: Autor

Tabla 7. Absorbancias a 283 nm de los extractos de flavonoides del epicarpio de cáscara de cacao

N°	X1 EtOH:H_2O, v/v	X2 HCl, %	X3 Temperatura, °C	Absorbancia (283 nm)
1	50:50	0	30	0,295
2	50:50	0	50	0,322
3	50:50	1	30	0,189
4	50:50	1	50	0,171
5	80:20	0	30	0,593
6	80:20	0	50	0,480
7	80:20	1	30	0,114
8	80:20	1	50	0,109
9	65:35	0,5	40	0,417

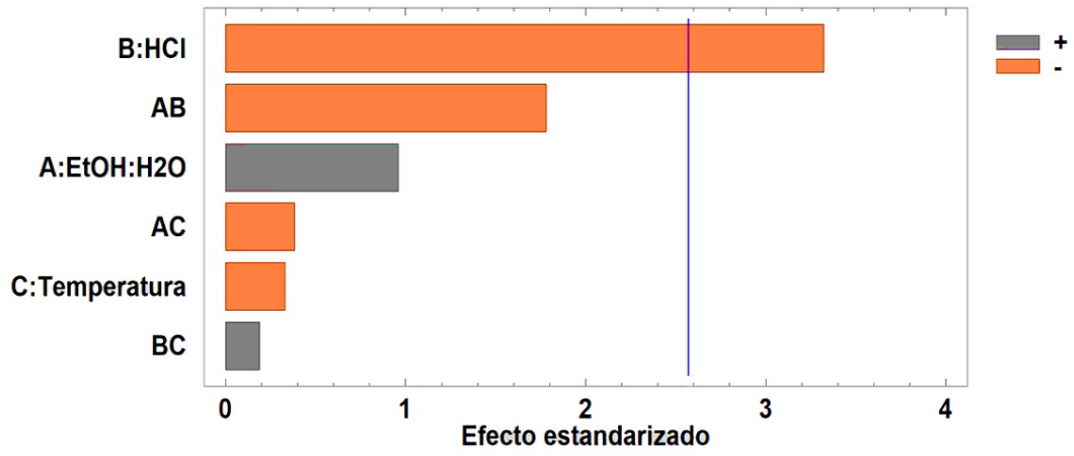
Tabla 7 (continuación)

10	65:35	0,5	40	0,445
11	65:35	0,5	40	0,442
12	65:35	0,5	40	0,458

FUENTE: Autor

Para el análisis de los datos del diseño experimental se empleó el *software Statgraphics* (*Statpoint Technologies*, *Inc*., Virginia, EE.UU, Versión XVII) con un diseño de cribado. En la **Tabla 7** se puede observar que el máximo de absorbancia a 283 nm se obtuvo con una relación EtOH:H_2O 80:20 (nivel 1), 0 % de HCl (nivel -1) y una temperatura de 30 °C (nivel -1). La **Figura 11** muestra el diagrama de Pareto de los resultados obtenidos, mediante el cual se pueden observar las variables o interacciones de variables que presentan los efectos que más contribuyen a la varianza. Las variables o interacciones de variables que se encuentran en la zona de mayor efecto estandarizado (zona derecha de la línea azul) explican el 80 % de la varianza de los datos, mientras que las que se encuentran en la zona de menor efecto estandarizado (zona izquierda de la línea azul) no contribuyen significativamente al proceso. Tal como se ejecutó el diseño, únicamente la variable X2 (% HCl) contribuyó en el 80 % de la varianza de los datos.

Figura 11. Diagrama de Pareto



FUENTE: Autor

Estos datos son comparables con los resultados de otras investigaciones publicadas. Aunque la relación de disolventes y la temperatura aparentemente no contribuyen de forma significativa a la varianza, se ha reportado que la concentración de etanol y la temperatura son los parámetros más importantes en el proceso de extracción de flavonoides asistida por ultrasonido desde cascarilla de cacao.[41] Por otra parte, se registran resultados en los cuales el % de etanol como co-disolvente es el factor más influyente en la obtención de extractos fenólicos empleando fluido supercrítico;[47] y también, se reporta que el contenido de polifenoles totales de extractos de cáscara de cacao, empiezan a disminuir su valor después de cierta potencia y tiempo de calentamiento en extracción asistida con microondas.[48]

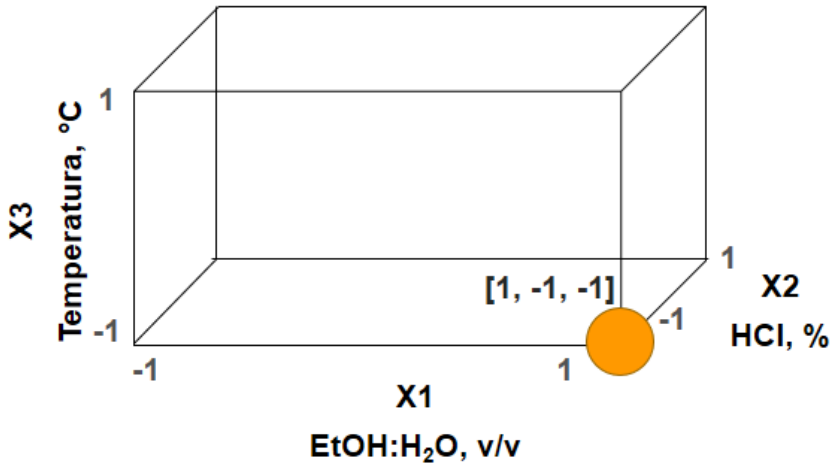
Tabla 8. Análisis de varianza para la Absorbancia (283 nm)

Fuente	***Suma de Cuadrados***	***Gl***	***Cuadrado Medio***	***Razón-F***	***Valor-P***
A:EtOH:H2O	0,0127257	1	0,0127257	0,92	0,3818
B:HCl	0,152791	1	0,152791	11,03	0,0210
C:Temperatura	0,00151058	1	0,00151058	0,11	0,7546
AB	0,0438983	1	0,0438983	3,17	0,1351
AC	0,00201835	1	0,00201835	0,15	0,7183
BC	0,000496598	1	0,000496598	0,04	0,8572
Error total	0,0692368	5	0,0138474		
Total (corregido)	0,282678	11			

FUENTE: Autor

[47] VALADEZ-CARMONA, Lourdes, *et al*. Valorization of Cacao Pod Husk through Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds. *J. Supercrit. Fluids* 2017,vol 131.
[48] MASHUNI; Hamid, *et al*. The Determination of Total Phenolic Content of Cocoa Pod Husk Based on Microwave-Assisted Extraction Method. 2020; p 030013.

Figura 12. Coordenadas obtenidas del diseño experimental



FUENTE: Autor

La **Tabla 8** muestra el análisis de varianza de la absorbancia a 283 nm como variables de respuesta. En esta se muestran las sumas de cuadrados, los grados de libertad (GI), los cuadrados medios y los valores del estadístico F junto a sus correspondientes niveles críticos. Tal como se observa, el valor mayor estadístico F lo genera la variable % HCl, y ya que su valor P es menor a 0,05, se concluye que se puede rechazar la hipótesis de que todas las medias (cuadrados medios) son iguales. En la **Figura 12** se graficó el cubo experimental con las 8 coordenadas (vértices) de extracción estudiadas, y se mostró la coordenada experimental óptima del diseño en [1, -1, -1], es decir: relación EtOH:H_2O 80:20, 0 % de HCl y temperatura de 30 °C.

Aplicación de condiciones óptimas para la obtención de extractos de epicarpio de cáscara de cacao (EECC)

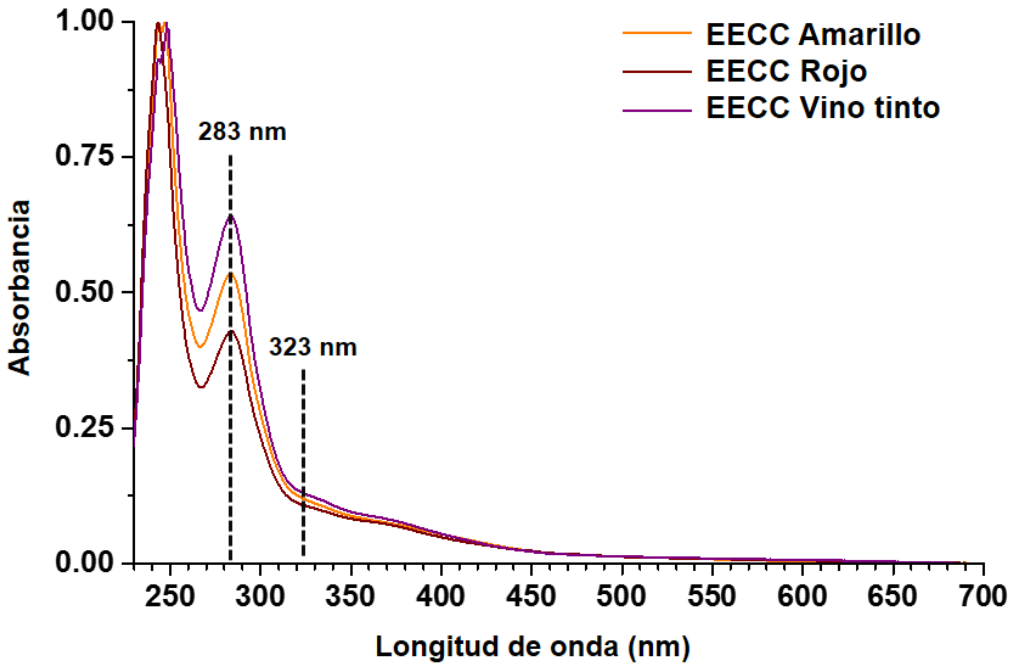
Una vez realizado el análisis estadístico en el diseño experimental, se implementaron las condiciones óptimas (relación EtOH:H_2O 80:20, 0 % de HCl y temperatura de 30 °C) para obtener los tres EECC coloreados (**Tabla 9**).

Tabla 9. Rendimientos de extracción

	EECC Amarillo	EECC Rojo	EECC Vino tinto
Material extraído			
Rendimiento de extracción	25,39 %	21,48 %	16,44 %

FUENTE: Autor

Figura 13. Espectros UV-Vis de los EECC



FUENTE: Autor

Un aspecto importante en el cual se basó esta metodología de extracción fue en la asistencia del ultrasonido. Las ondas ultrasónicas constituyen uno de los tres grupos de clasificación de las ondas sonoras, asociadas a frecuencias entre 20 kHz y 10 MHz. Durante el proceso de extracción, se generan microburbujas de cavitación de diferente amplitud, las cuales oscilan y colapsan entre sí, ocasionando diversos

efectos, tales como: ondas de choque, microjets, turbulencia y fuerza de corte. Como resultado, se logra la ruptura de las paredes celulares vegetales y se incrementan los poros sobre las superficies de las células, favoreciendo la salida de compuestos bioactivos, siendo en nuestro caso los flavonoides.[41]

Los tres EECC obtenidos fueron nuevamente analizados por espectroscopía UV-VIS. Tal como se observa en la **Figura 13**, se registran en los espectros las dos bandas de absorción típicas de los flavonoides, y los espectros se muestran completamente similares, con diferencia en sus intensidades. La homología en las bandas de absorción de los tres EECC, puede deberse a que estos extractos son mezclas complejas de diversas familias de flavonoides (flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas, antocianinas, chalconas, antocianinas, isoflavonoides, etc.), por lo cual, la suma de todos estos compuestos permitirá obtener perfiles de absorción similares. El color de los EECC se podrá relacionar con los espectros de reflectancia difusa discutidos más adelante.

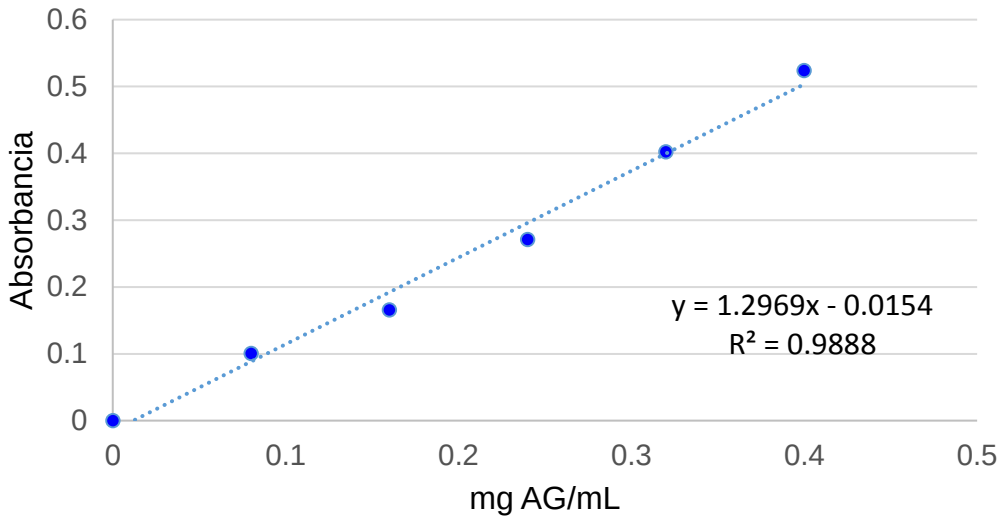
4.3 DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

El ensayo de Folin-Ciocalteu (FC) contempla en su etapa inicial, la disolución del compuesto polifenólico en una solución básica de Na_2CO_3, el cual abstrae un protón del polifenol permitiendo la formación de un ión fenolato. Al agregar a la solución el reactivo de FC, el cual es una mezcla de ácidos fosfomolíbdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) y fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$) de color amarillo, el ión fenolato es capaz de reducir el reactivo de FC generando un complejo de Mo (V) de color azul cuya absorbancia puede ser medida a 760 nm.[49] En la **Figura 14** se observa la curva de calibración de ácido gálico construida. En esta se registra la ecuación de la recta por la cual se calcularon las concentraciones de polifenoles en los EECC y el valor de coeficiente de determinación (R^2) de 0,9888, el cual garantiza un buen ajuste del modelo predictivo a los datos experimentales, considerando un error experimental ≤ 5%.

---

[49] MUNOZ-BERNAL, Oscar, *et al*. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo de Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación de Polifenoles Totales. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 2017, vol 20, nro 23.

Figura 14. Curva de calibración de ácido gálico



FUENTE: Autor

Tabla 10. Polifenoles totales en los EECC

	EECC Amarillo	EECC Rojo	EECC Vino tinto	Literatura
mg AG/g EECC	162 ± 1,9	150 ± 12	168 ± 9,4	3,53 y 3,65 MeOH:$(CH_3)_2CO$ 94,92 $(CH_3)_2CO$:H_2O 7:3 49,92 EtOH (70 %)

FUENTE: Autor

Al comparar los resultados del contenido polifenólico de los EECC (**Tabla 10**) con otros trabajos en la literatura, se puede observar una gran variabilidad en los datos reportados. Esto se puede presentar, debido al efecto que ejercen el clon empleado, la ubicación del cultivo de cacao, el método de extracción empleado, u otros factores que modifican el contenido de polifenoles. En general, los valores obtenidos se pueden comparar con los reportados mediante una extracción con EtOH al 70%, cuyos polifenoles totales fueron 49,92 mg AG/g de extracto, sin embargo, debemos recordar que este valor corresponde a los polifenoles en toda la cáscara de cacao, no solo del epicarpio, por lo cual es conveniente pensar que el contenido de polifenoles en extractos de solo epicarpio de cáscara sean mayores.[8]

4.4 ANÁLISIS DEL PERFIL DE FLAVONOIDES DE LOS EECC EMPLEANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

Para el análisis e identificación del perfil de flavonoides en los EECC, se empleó la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF basados en sus ventajas analíticas. La ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI, *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) es un método de ionización suave en el cual se preserva la estructura química de los analitos estudiados, que generalmente son moléculas lábiles, no volátiles y termoinestables como lo son los flavonoides. A diferencia de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), MALDI-TOF se caracteriza por bajos tiempos de análisis, alta sensibilidad, gran tolerancia a contaminantes y una buena capacidad de análisis de mezclas complejas sin el requerimiento de grandes cantidades de disolventes, razones que justifican su elección y versatilidad como herramienta instrumental para el análisis de este tipo de compuestos.[50]

Los descriptores analíticos empleados fueron: la exactitud en la masa (**Ecuación 1**), la resolución y el cociente señal/ruido (S/N, *signal*/*noise*). La identificación tentativa de los flavonoides se realizó de acuerdo a la base de datos *Phenol-Explorer: Database on polyphenol content in foods* que cuenta con 502 polifenoles reportados, de los cuales 274 son flavonoides.[51]

Ecuación 1. $$\Delta \boldsymbol{ppm} = \frac{\boldsymbol{Masa_{calculada} - Masa_{experimental}}}{\boldsymbol{Masa_{calculada}}} * \mathbf{10^6}$$

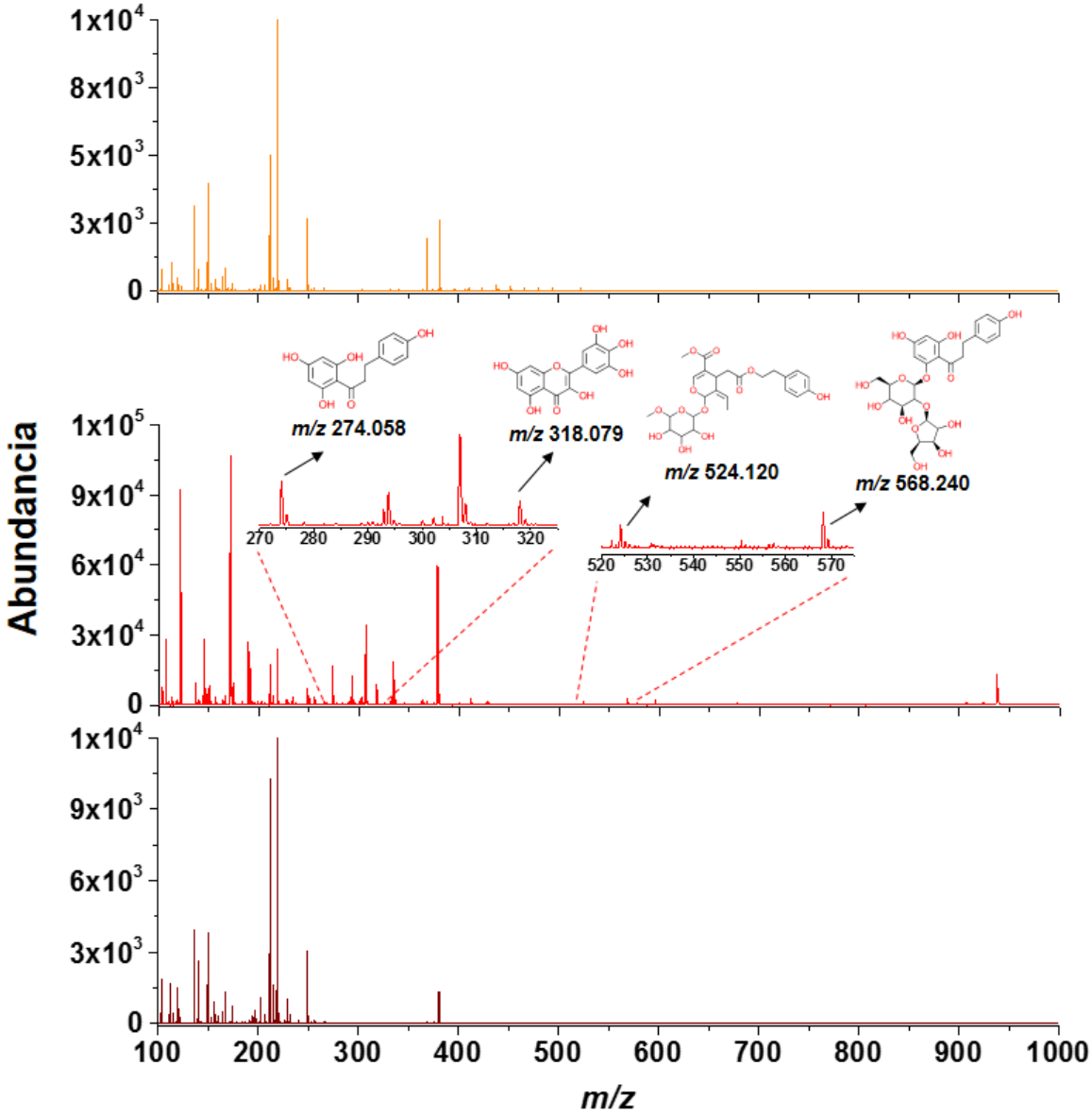
Inicialmente, se realizaron experimentos LDI-TOF para los tres EECC (amarillo, rojo y vino tinto) con el fin de identificar la presencia de flavonoides bajo estas condiciones. La técnica LDI (Laser Desorption Ionization) no utiliza matriz, por lo cual los compuestos son ionizados según su capacidad para absorber la radiación del láser.

---

[50] WANG, J.; KALT, W.; SPORNS, P. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS Analysis of Anthocyanins in Highbush Blueberries. *J. Agric. Food Chem.* 2000, vol 48 nro 8, pp 3330–3335.
[51] NEVEU, V, *et al*. Phenol-Explorer: An Online Comprehensive Database on Polyphenol Contents in Foods. 2010.

Esta técnica es apropiada para el análisis de moléculas π conjugadas, sales orgánicas e inorgánicas, colorantes, porfirinas o polímeros sintéticos, sin embargo, LDI es un método menos suave que MALDI debido a que gran parte de las moléculas analizadas se pueden fraccionar.[52]

Figura 15. Espectros LDI de los EECC amarillo, rojo y vino tinto



FUENTE: Autor

[52] GROSS, Jurgen. Mass Spectrometry, Ed 1; *Springer*, 2004.

En la **Figura 15** se observa un elevado número de señales en cada uno de los EECC entre 100 y 250 *m/z*, no obstante, las señales identificadas en esta zona no correspondieron a ninguno de los compuestos polifenólicos reportados en la base de datos *Phenol-Explorer*, y ya que para lograr la desorción/ionización el láser se ajusta a altas energías, es correcto pensar que estas señales corresponden a los fragmentos de los compuestos presentes inicialmente. Al analizar la zona entre 250 y 400 *m/z* en la cual se pueden encontrar flavonoides básicos (no glicosidados), se lograron identificar 4 compuestos en el EECC rojo: Floretina con *m/z* de 274,058, miricetina con *m/z* 318,079, ligtrósido con *m/z* 524,120 y Floretina-2´-*O*-xilosil-glucósido con *m/z* 568,231. En la **Tabla 11** se registran las abundancias de estos picos y la exactitud en las masas, la cual debe tener valores <150ppm para garantizar la asignación estructural, esto teniendo en cuenta la resolución media del equipo empleado.

Tabla 11. Compuestos identificados en el espectro LDI del EECC rojo

Compuesto	Fórmula	Masa experimental	Masa Monoisotópica	Exactitud en la masa
Floretina	$C_{15}H_{14}O_5$	274,058	274,08412	95
Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	318,079	318,0357	136
Ligtrosido	$C_{25}H_{32}O_{11}$	524,120	524,18938	132
Floretina-2´-*O*-xilosil-glucósido	$C_{26}H_{32}O_{14}$	568,231	568,17921	91

FUENTE: Autor

Posteriormente, cada uno de los extractos fue analizado empleando la técnica MALDI-TOF basados en el método de ionización por transferencia electrónica (ET, *electronic transfer*). El proceso de ET en modo ion positivo, inicia con la absorción multifotónica de radiación láser por parte de las moléculas de matriz (M), permitiendo una etapa de ionización primaria mediante un mecanismo de "*pooling*",[53] luego se lleva a cabo una etapa de ionización secundaria en fase gaseosa, en la cual moléculas neutras (A:analitos) transfieren un electrón a la matriz, quedando así los analitos en forma de catión radical ($A^{+\bullet}$). Las reacciones

asociadas a la ionización secundaria solo son posibles si el potencial de ionización (IP, *Ionization Potential*) del analito es menor que el potencial de ionización de la matriz (**Ecuación 2**).[54]

Ecuación 2. $$M \xrightarrow{nh\nu} M^{+\bullet} + A \rightarrow A^{+\bullet} + M \quad (IP_A < IP_M)$$

La eficiencia de los experimentos MALDI-TOF, depende en gran medida de las matrices empleadas durante el análisis. A razón de ello, se emplearon tres matrices de transferencia electrónica: la matriz comercial *trans*-2-[3-(4-ter-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno]-malonitrilo (DCTB) y dos matrices tipo α-cianofenilenvinilenos (CNFV-CH_3 y CNFV-OCH_3) sintetizadas y reportadas por el grupo de investigación GIFTEX.[55] La selección de estas matrices se hizo con base a sus propiedades fisicoquímicas favorables: alto potencial de ionización, eficiencia de absorción fotónica para obtención de iones primarios, buena solubilidad en disolventes comunes en MALDI-TOF, alta estabilidad en el vacío y eficiencia en formación de iones secundarios; lo que ha permitido el análisis de distintas mezclas complejas incluyendo: petroporfirinas, porfirinas, hidrocarburos poliaromáticos, fullerenos, pigmentos, entre otros.[56,57] Por su parte, la matriz DCTB fue empleada debido a sus aplicaciones en el estudio de compuestos lábiles y termoinestables.[58]

---

[53] KARBACH, Volker.; KNOCHENMUSS, Richard. Do Single Matrix Molecules Generate Primary Ions in Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, vol 12 nro 14, pp 968–974.

[54] MCCARLEY, Tracy. Donovan.; MCCARLEY, Robin. L.; LIMBACH, Patrick. A. Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 1998, vol 70, nro 20, pp 4376–4379.

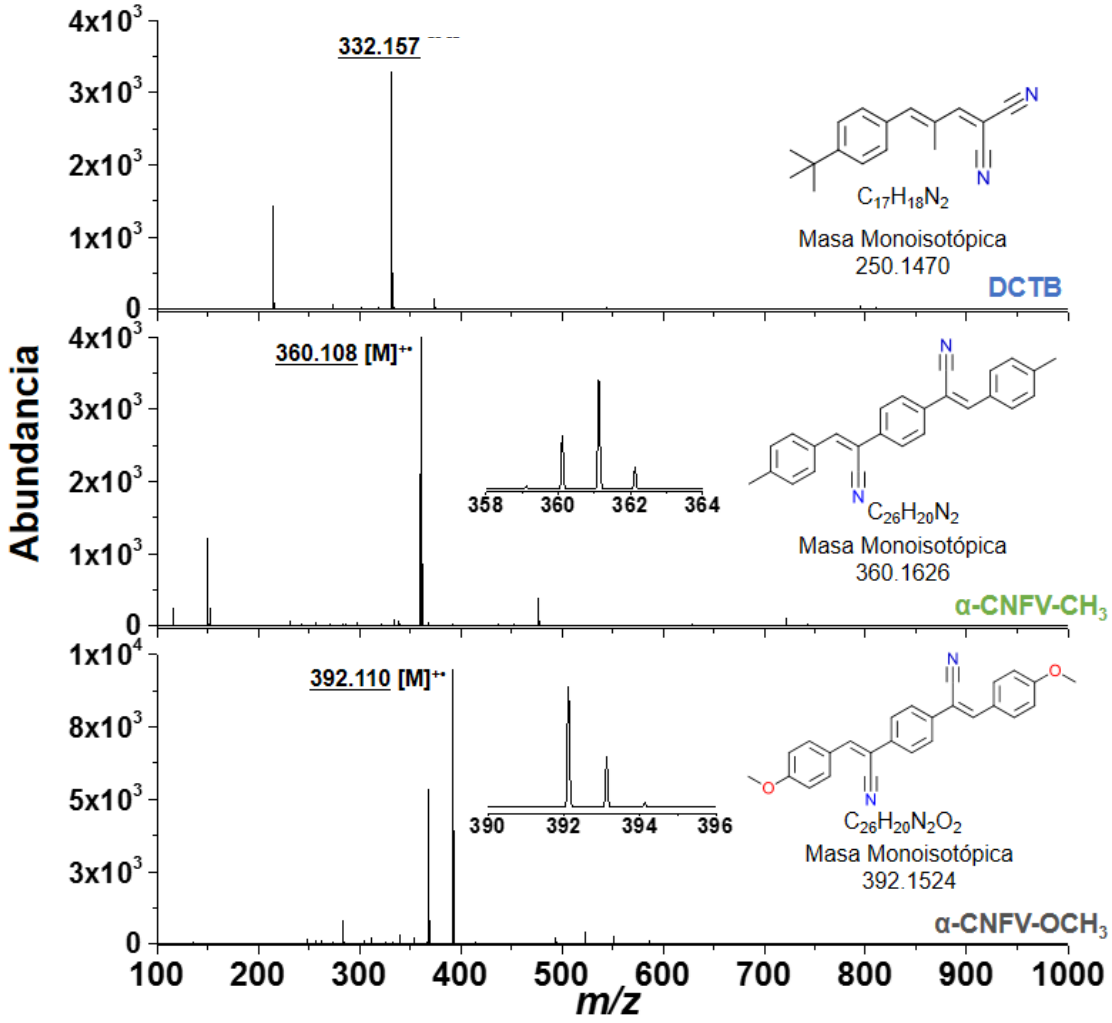
[55] CASTELLANOS-GARCÍA, Laura J, *et al*. Oligo P-Phenylenevinylene Derivatives as Electron Transfer Matrices for UV-MALDI. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017, vol 28, nro 12, pp 2548–2560.

[56] RAMIREZ, Juan.; BLANCO, Cristian.; COMBARIZA, Marianny. Electron-Transfer Ionization of Nanoparticles, Polymers, Porphyrins, and Fullerenes Using Synthetically Tunable α-Cyanophenylenevinylenes as UV MALDI-MS Matrices. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, vol 11, nro 11, pp 10975–10987.

[57] DÍAZ, Luis. Identificación de Biomarcadores Fitoplanctónicos Utilizando Espectrometría de Masas MALDI TOF Con Matrices de Transferencia Electrónica, Trabajo de Investigación, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander, 2019.

[58] VASIL'EV, Y. V, *et al*. Electron Transfer Reactivity in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI): Ionization Energy, Electron Affinity and Performance of the DCTB Matrix within the Thermochemical Framework. *J. Phys. Chem. A* 2006, vol 110, nro 18, pp 5967–5972.

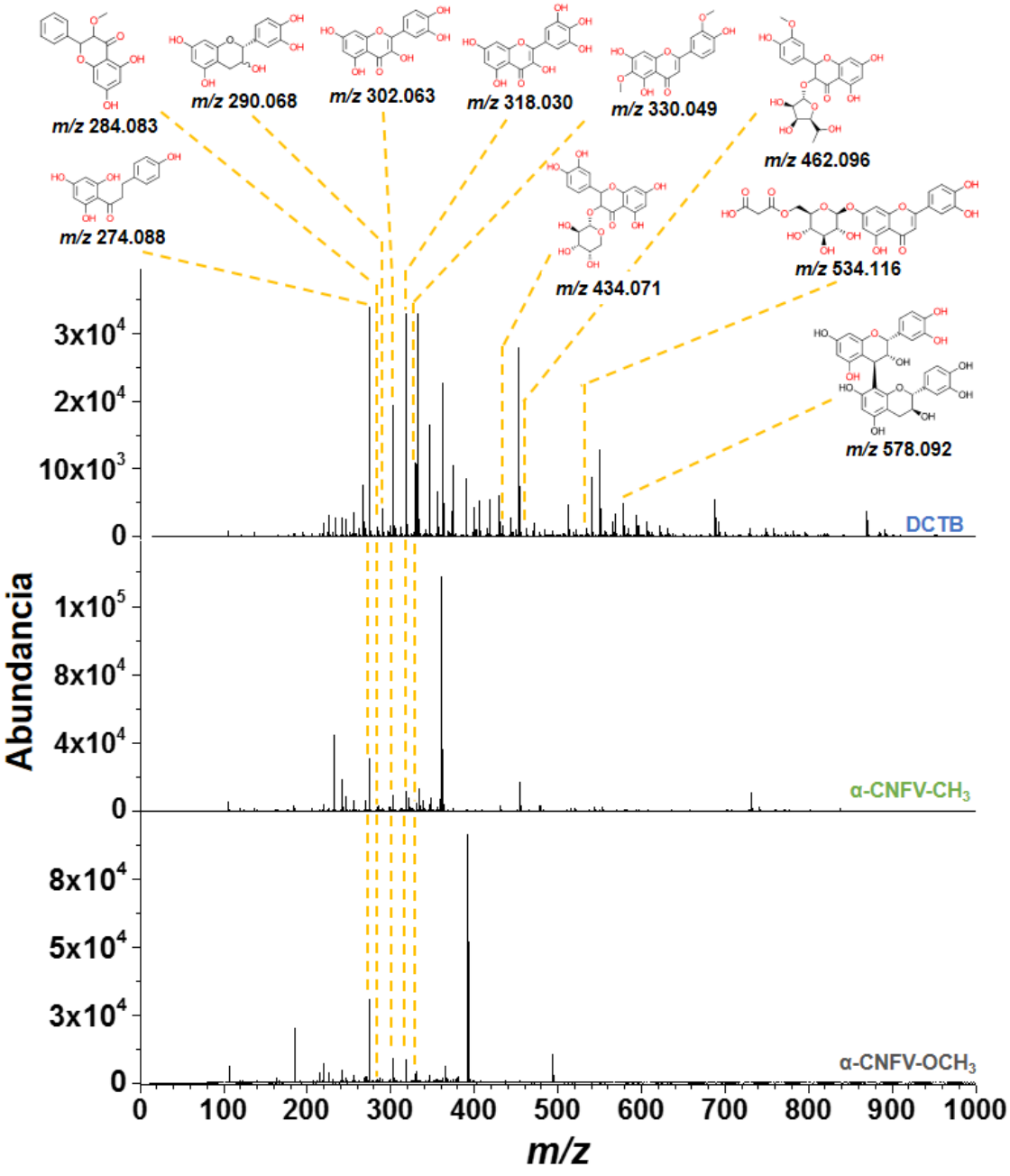
Figura 16. Espectros LDI de las matrices DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3.



FUENTE: Autor

En la **Figura 16** se registran los espectros LDI-TOF de las tres matrices empleadas. En los espectros LDI de las matrices α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3 se observan las señales de mayor intensidad correspondientes al ión molecular (catión radical) de cada matriz junto con su patrón isotópico. Del mismo modo, se pudieron identificar otras señales de intensidad apreciable, asociadas a *clusters* o aductos que pudiesen interferir con la región de masas de los flavonoides. En el caso de la matriz DCTB, se observa que la señal de mayor intensidad no corresponde al catión radical sino a un aducto.

Figura 17. Espectros MALDI-TOF del EECC amarillo empleando DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3 como matrices ET MALDI



FUENTE: Autor

Al analizar por MALDI-TOF los EECC, se evidenció que la mayoría de señales aparecen en la zona de *m/z* 200 a *m/z* 600 (ventana de análisis de los flavonoides)

y una pequeña cantidad de picos aparecen a mayores valores de m/z, relacionados mayormente con antocianinas. En la **Figura 17** se muestran los distintos compuestos identificados en el EECC Amarillo. Para garantizar que las fórmulas moleculares asignadas fueran correctas, se tuvo en cuenta que la relación S/N fuese mayor a 3, que la exactitud en la masa fuese menor a 150 ppm y que el patrón isotópico experimental correspondiera con el patrón isotópico calculado.

Empleando estos criterios, para el EECC amarillo fueron identificados 10 compuestos: 5 flavonoles, 2 flavonas, 2 flavanoles y una dihidrochalcona. En la **Figura 20** se registran los flavonoides reportados en grano y en cáscara de cacao, de los cuales solo coinciden: (+)-catequina y (-)-epicatequina que aparecen en *m/z* 290,068, pero al ser estereoisómeros (igual masa molecular pero diferente disposición espacial) no se pueden distinguir por técnicas espectrométricas, la quercetina que aparece en *m/*z 302,063 y la procianidina B1 en *m/*z 578,092. Cinco compuestos fueron identificados en común en las tres matrices, sin embargo, la matriz DCTB fue la que mostró el mayor número de señales. Esto pudo deberse a que la matriz DCTB presenta un alto potencial de ionización, baja estabilidad en el vacío y baja presión de vapor, y esto sumado a la capacidad que tiene esta matriz para ionizar a los analitos, favoreció la ionización de un mayor número de compuestos.

Tabla 12. Compuestos identificados en los espectros MALDI-TOF del EECC Amarillo empleando las matrices: DCTB, CNFV-CH_3 y CNFV-OCH_3.

Compuesto	Fórmula	DCTB	CNFV-CH_3	CNFV-OCH_3	Masa Calc	Masa Exp	Exactitud en la masa	Patrón isotópico	
								Calc	Exp
Floretina	$C_{15}H_{14}O_5$	X	X	X	274.084	274.088	15	100 16.58 2.31	100 24.74 2.52
Metilgalangina	$C_{16}H_{12}O_5$	X	X	X	284,068	284.083	53	100 17.63 2.49	100 17.40
(+)Catequina/ (-)-Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$	X			290.079	290.068	37	100 16.61 2.53	100 14.28

Tabla 12 (continuación)

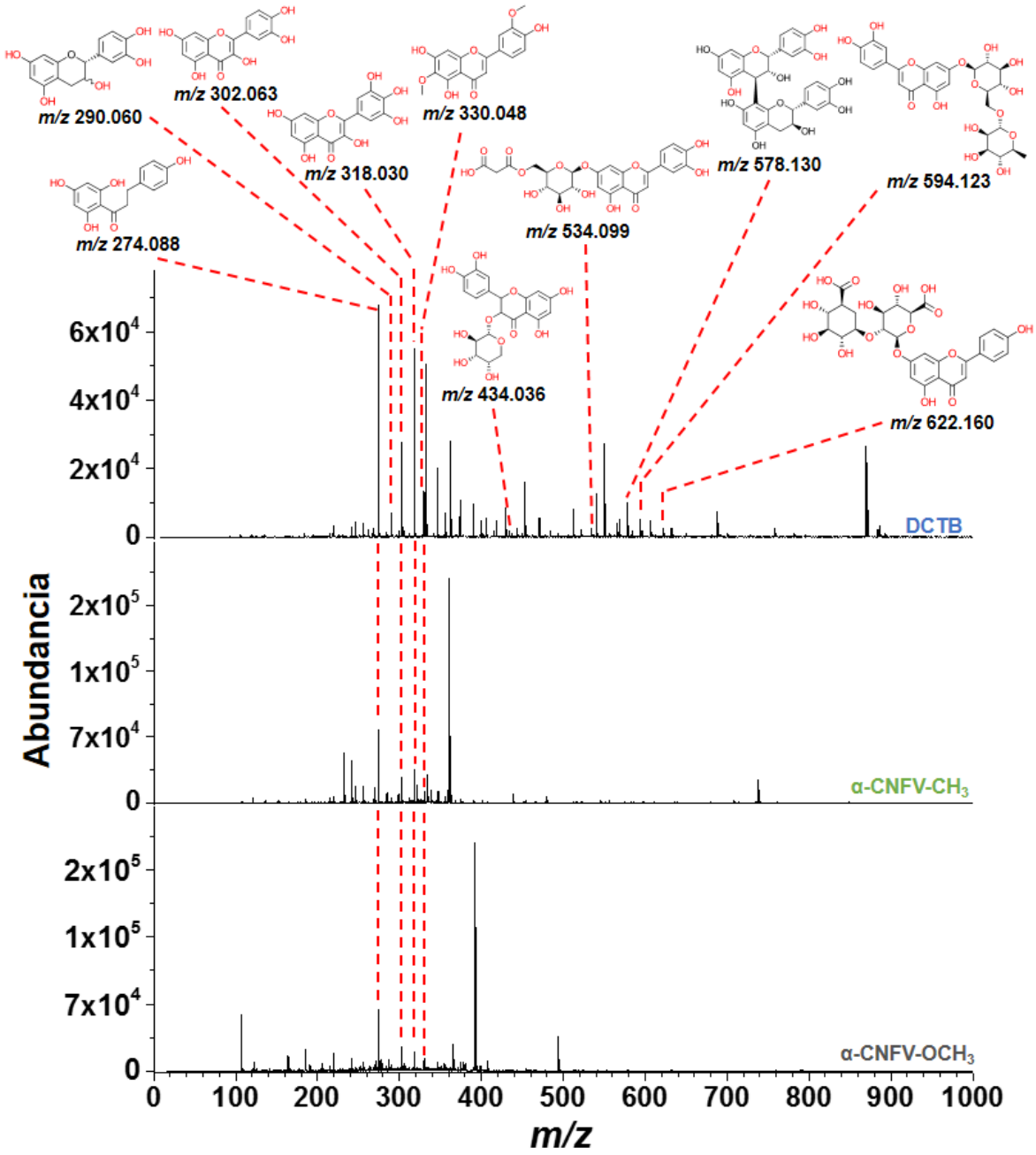
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	X	X	X	302.042	302.063	70	100 16.61 2.73	100 17.63 7.73
Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	X	X	X	318.037	318.030	22	100 16.64 2.94	100 24.62 2.77
Jaceosidina	$C_{17}H_{14}O_7$	X	X	X	330.073	330.049	72	100 18.81 3.11	100 20.94
Quercetin-3-*O*-arabinósido	$C_{20}H_{18}O_{11}$	X			434.084	434.071	30	100 22.26 4.62	100 23.63 5.02
Isoramnetina-3-*O*-rutinósido	$C_{22}H_{22}O_{11}$	X			462.116	462.096	43	100 24.47 5.12	100 29.68 12
Luteolin 7-*O*-malonil-glucósido	$C_{24}H_{22}O_{14}$	X			534.100	534.116	30	100 26.74 6.31	100 35.69
Procianidina B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	X			578.142	578.092	86	100 33.20 7.80	100 34.57 7.75

FUENTE: Autor

Muchos de estos flavonoides identificados también se han encontrado en otras fuentes vegetales o alimentos como: aceites, frutas, semillas, cervezas, vinos, cereales, hierbas, especies, café y té, etc.[51]

En la **Figura 18** se muestran los compuestos identificados en el EECC Rojo. Se puede observar que algunos de los compuestos identificados en el EECC Amarillo también aparecen en este extracto, como la floretina (*m/z* 274,088), la catequina (*m/z* 290,060) la quercetina (*m/z* 302,063), la miricetina (*m/z* 318,024), la jaceosidina (*m/z* 330,048), la quercetin 3-*O*-arabinósido (*m/z* 434,036), la luteolin 7-*O*-malonil-glucósido (*m/z* 534,099) y la procianidina B1 (*m/z* 578,130). Aunque en la **Tabla 13** solo se muestra la identificación de 10 compuestos en este EECC, hubo algunas señales entre *m/z* 600 y 800 que no fueron identificadas según la base de datos empleada, y estas señales posiblemente corresponden a antocianinas y flavonoides glicosidados que son responsables en cierta medida del color rojo de este extracto de cáscara de cacao.

Figura 18. Espectros MALDI-TOF del EECC Rojo empleando DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3 como matrices ET MALDI



FUENTE: Autor

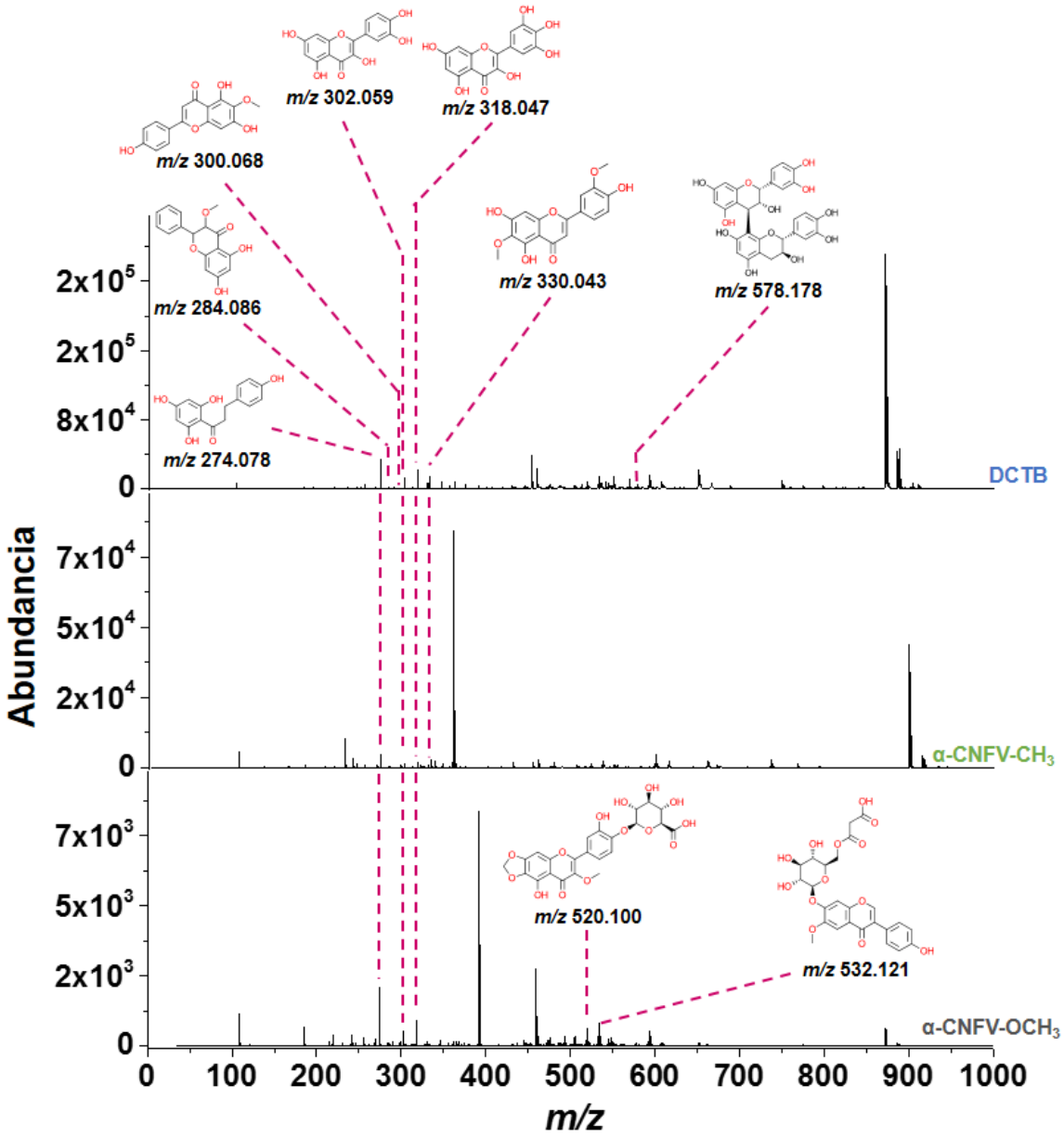
Tabla 13. Compuestos identificados en los espectros MALDI-TOF del EECC Rojo empleando las matrices: DCTB, CNFV-CH_3 y CNFV-OCH_3.

Compuesto	Fórmula	DCTB	CNFV-CH_3	CNFV-OCH_3	Masa Calc	Masa Exp	Exactitud en la masa	Patrón isotópico	
								Calc	Exp
Floretina	$C_{15}H_{14}O_5$	X	X	X	274.084	274.088	22	100 16.58 2.31	100 18.80 1.45
(+)Catequina/ (-)-Epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$	X			290.079	290.060	65	100 16.61 2.53	100 12.47
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	X	X	X	302.042	302.063	70	100 16.61 2.73	100 16.87
Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	X	X	X	318.037	318.030	22	100 16.64 2.94	100 17.86 1.75
Jaceosidina	$C_{17}H_{14}O_7$	X	X	X	330.073	330.048	76	100 18.81 3.11	100 18.04
Quercetin-3-O-arabinósido	$C_{20}H_{18}O_{11}$	X			434.084	434.036	110	100 22.26 4.62	100 23.46 5.54
Luteolin 7-O-malonil-glucósido	$C_{24}H_{22}O_{14}$	X			534.100	534.099	2	100 26.74 6.31	100 30.79
Procianidina B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	X			578.142	578.130	21	100 33.20 7.80	100 33.60 6.38
Luteolin 7-O-rutinósido	$C_{27}H_{30}O_{15}$	X			594.158	594.123	59	100 30.12 7.46	100 31.69
Apigenin 7-O-diglucurónido	$C_{27}H_{26}O_{17}$	X			622.117	622.160	69	100 30.15 7.88	

FUENTE: Autor

La **Tabla 14** y la **Figura 19** exhiben los compuestos identificados en el EECC Vino tinto. Se puede observar que muchos de los compuestos identificados son comunes en todos los EECC, tales como: floretina (*m/z* 274,082), quercetina (*m/z* 302,059), miricetina (*m/z* 318,047), jaceosidina (*m/z* 330,043) y procianidina dímero B1 (*m/z* 578,092). En total se lograron identificar 9 compuestos en este extracto, no obstante, hubo señales que no fueron identificadas de acuerdo a la base de datos, especialmente en la zona de antocianinas y flavonoides glicosidados (*m/z* 600 a 800).

Figura 19. Espectros MALDI-TOF del EECC Vino tinto empleando DCTB, α-CNFV-CH_3 y α-CNFV-OCH_3 como matrices ET MALDI



FUENTE: Autor

Algunos de estos compuestos se pueden asociar directamente con el color propio del EECC según reportes de la literatura. Se han reportado como flavonoides de color amarillo: la luteolina, la quercetina, la morina, el kaemferol, la ramnetina, la miricetina y flavonoides del grupo de las auronas, los flavonoles y las chalconas;

como flavonoides de color rojo se han registrado antocianinas y antocianidinas (pelargonidina, peonidina y cianidinas) y como flavonoides de color morado, se han asociado algunos tipos de antocianidinas como: la delfinidina, la petunidina y la malvidina.[59,60]

Tabla 14. Compuestos identificados en los espectros MALDI-TOF del EECC Vino tinto empleando las matrices: DCTB, CNFV-CH_3 y CNFV-OCH_3.

Compuesto	Fórmula	DCTB	CNFV-CH_3	CNFV-OCH_3	Masa Calc	Masa Exp	Exactitud en la masa	Patrón isotópico	
								Calc	Exp
Floretina	$C_{15}H_{14}O_5$	X	X	X	274.084	274.082	15	100 16.58 2.31	100 13.72 1.17
Metilgalangina	$C_{16}H_{12}O_5$	X			284,068	284.086	63	100 17.63 2.49	100 16.80
Hispiludina	$C_{16}H_{12}O_6$	X			300.063	300.068	17	100 17.67 2.70	100 17.00
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	X	X	X	302.042	302.059	56	100 16.61 2.73	100 13.05
Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	X	X	X	318.037	318.047	31	100 16.64 2.94	100 16.4 3.94
Jaceosidina	$C_{17}H_{14}O_7$	X	X		330.073	330.043	91	100 18.81 3.11	100 14.73
5,3',4'-Trihidroxi-3-metoxi-6:7-metilendioxiflavona 4'-O-glucurónido	$C_{23}H_{20}O_{14}$			X	520.085	520.100	29	100 25.64 6.03	100 33.52
6''-O-Malonilglicitina	$C_{25}H_{24}O_{13}$			X	532.183	532.121	116	100 27.81 6.39	100 45.73
Procianidina B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	X			578.142	578.092	62	100 33.20 7.80	100 31.20

FUENTE: Autor

[59] BECHTOLD, Thomas.; MUSSAK, Rita. *Handbook of Natural Colorants*; Wiley, 2009.
[60] AZEEZ, Shamina.; SHIVA, K. N.; VA, Parthasarathy. Food Colours of Plant Origin. *Cab Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 2007, vol 2.

Con respecto al patrón isotópico de los compuestos identificados, para la mayoría de estos se cumple que los valores experimentales del [M+1] y en los casos observados del [M+2] son mayores a los valores teóricos, lo cual concuerda con los reportes en la literatura. En los casos en donde el patrón experimental fue menor que el teórico, se tuvo en cuenta que ese compuesto haya sido identificado correctamente y con un adecuado patrón isotópico en los otros EECC como en el caso de la floretina, la quercetina y la jaceosidina en el EECC Vino tinto.

Tabla 15. Compuestos identificados en los EECC Amarillo, Rojo y Vino tinto.

Compuesto	Fórmula	EECC Amarillo	EECC Rojo	EECC Vino tinto
Floretina	$C_{15}H_{14}O_5$	X	X	X
Metilgalangina	$C_{16}H_{12}O_5$	X		X
(+)-Catequina y/o (-)-epicatequina	$C_{15}H_{14}O_6$	X	X	
Hispidulina	$C_{16}H_{12}O_6$			X
Quercetina	$C_{15}H_{10}O_7$	X	X	X
Miricetina	$C_{15}H_{10}O_8$	X	X	X
Jaceosidina	$C_{17}H_{14}O_7$	X	X	X
Quercetina 3-O-arabinósido	$C_{20}H_{18}O_{11}$	X	X	
Isoramnetina 3-O-rutinósido	$C_{22}H_{22}O_{11}$	X		
5,3´,4´-Trihidroxi-3-metoxi-6:7-metilendioxiflavona 4'-O-glucurónido	$C_{23}H_{20}O_{14}$			X
6´´-O-malonilglicitina	$C_{25}H_{24}O_{13}$			X
Luteolin 7-O-malonil-glucósido	$C_{24}H_{22}O_{14}$	X	X	
Procianidina dímero B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	X	X	X
Luteolin -O-rutinósido	$C_{27}H_{30}O_{15}$		X	
Apigenin 7-O-diglucurónido	$C_{27}H_{26}O_{17}$		X	

FUENTE: Autor

En la **Tabla 15** se registran en total 15 flavonoides dentro de los EECC. Esta identificación presuntiva se puede comparar con los flavonoides y polifenoles reportados en el grano y la cáscara de cacao (**Figura 20**), de estos coinciden con los compuestos identificados: la (+)-catequina y (-)-epicatequina (*m/z* 290.079) y la quercetina (*m/z* 300.063) que se han reportado tanto en cáscara como en grano, y la quercetin-3-*O*-arabinósido (*m/z* 434.084) y la procianidina B1 (*m/z* 578.142) que solo se han reportado en grano.

Figura 20. Alcaloides, ácidos fenólicos y flavonoides reportados en el grano y la cáscara de cacao.

Flavonoides en grano

Alcaloides (Xantinas)

Cafeina
Teobromina
Teofilina

Flavanoles

(-)-epicatequina
(+)-catequina
(+)-galocatequina
(-)-epigalocatequina

Flavonas

Luteolina
Luteolin-6-C-glucósido
Luteolin-8-C-glucósido
Luteolin-7-O-glucósido
Apigenina
Apigenin-6-C-glucósido
Apigenin-7-C-glucósido
Apigenin-6-C-glucósido
Apigenin-7-C-rutinósido
Apigenin-6,8-C-arabinósido-C-glucósido

Procianidinas

Procianidina B1
Procianidina B2
Procianidina B3
Procianidina B4
Procianidina B5
Procianidina C1
Procianidina D
Procianidinas A y B oligoméricas

Flavonoles

Quercetina
Quercetina-3-O-rutinósido
Quercetin-3-O-glucósido
Quercetin-3-O-galactósido
Quercetin-3-O-arabinósido
Quercetin-ramnósido
Kaempferol
Kaempferol-3-O-rutinósido
Kaempferol-3-O-glucósido
Kaempferol-O-7-neohesperósido
Ramnetina

Ácidos fenólicos

Ácido clorogénico
Ácido ferúlico
Ácido coumárico
Ácido gálico
Ácido protocatecúico
Ácido *p*-hidroxibenzoico
Resveratrol

Flavanonas

Naringenina
Naringenin-7-O-glucósido
Naringenin-7-ramnósido-glucósido

Flavonoides en cáscara

(-)-epicatequina
(+)-catequina
Luteolina
Apigenin-6,8-C-arabinósido-C-glucósido
Quercetina
Ramnetina
Ácido coumárico
Ácido gálico
Ácido protocatecúico
Ácido *p*-hidroxibenzoico
Resveratrol

FUENTE: Referencias 61 a 67

Estos resultados permiten comprobar la eficiencia de la espectrometría de masas MALDI-TOF para caracterizar metabolitos secundarios en fuentes vegetales, en nuestro caso en específico, los flavonoides.

4.5 EVALUACIÓN DE PROPIEDADES COLORANTES

Para evaluar la capacidad colorante que tienen los EECC sobre algunos alimentos o materiales de fácil tinción, se optó por emplear cubos de celulosa bacteriana (CB) y muestras de yogurt. En primer lugar, se planteó un método de tinción sumergiendo los cubos de CB en soluciones acuosas de EECC [30 mg/mL] durante 24h a 4 °C bajo dos condiciones: a presión atmosférica y aplicando vacío.

---

[61] KARIM, Azila, *et al*. Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Wrinkles and Tyrosinase Inhibitory Activities of Cocoa Pod Extract. *BMC Complement. Altern. Med.* 2014, vol 14, p 381.

[62] WOLLGAST, Jan.; ANKLAM, Elke. Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition during the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification. *Food Res. Int.* 2000, vol 33, nro 6, pp 423–447.

[63] GUARATINI, Thais, *et al*. Application of Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight LIFT for Identification of Cocoa Condensed Tannins. *J. Mass Spectrom.* 2014, vol 49, pp 251–255.

[64] TORO-URIBE, Said, *et al*. Characterization of Secondary Metabolites from Green Cocoa Beans Using Focusing-Modulated Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2018, vol 1036, pp 204–213.

[65] SÁNCHEZ, Ferran, *et al*. Liquid Chromatographic/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Study of the Phenolic Composition of Cocoa (Theobroma Cacao). *J. Mass Spectrom.* 2003, vol 38, pp 35–42.

[66] RODRÍGUEZ, Yelko, *et al*. Fast Analysis of Polyphenols and Alkaloids in Cocoa-Based Products by Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS). *Food Res. Int.* 2018, vol 111, pp 229–236.

[67] VALADEZ-CARMONA, Lourdes, *et al*. Effects of Microwaves, Hot Air and Freeze-Drying on the Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, Enzyme Activity and Microstructure of Cacao Pod Husks (Theobroma Cacao L.). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2017, vol 41, pp 378–386.

Figura 21. Impregnación de cubos de CB a presión atmosférica y al vacío con soluciones acuosas de EECC

	Amarillo	**Rojo**	**Vino tinto**
Soluciones acuosas de EECC [30 mg/mL]			
Cubos de CB impregnados a presión atmosférica			
Pérdida de color a presión atmosférica	44,6 %	48 %	48,24 %
Cubos de CB impregnados al vacío			

FUENTE: Autor

Después de las 24 h de almacenamiento, se calculó el porcentaje (%) de pérdida de color de las soluciones acuosas de EECC mediante la siguiente ecuación:

$$(\%)\ \mathbf{Pérdida\ de\ color} = \frac{W_0 - W_1}{W_0} * 100$$

Donde W_0 es la absorbancia de la solución acuosa de EECC inicial y W_1 es la absorbancia de la solución de EECC después del procedimiento de impregnación sobre los cubos de CB. Estos valores de pérdida de color de las soluciones de EECC y las imágenes de los cubos de CB impregnados a presión atmosférica y al vacío se pueden apreciar en la **Figura 21**. Se puede observar que los porcentajes de pérdida de color de las soluciones de EECC después de un día de impregnación se relacionan directamente con la concentración de EECC que logra teñir los cubos de

CB, la cual representa un intervalo del 44 - 49 % de la concentración de EECC inicial.

La celulosa bacteriana (CB) es un polisacárido de función estructural que se produce a partir de microorganismos, específicamente cepas bacterianas como: *Gluconacetobacter*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Rhodobacter* y *Acetobacter xylinum*. Aunque la CB posee la misma estructura química que la celulosa vegetal $(C_6H_{10}O_5)_n$ esta se obtiene en fibras nanométricas, confiriéndole características de gran provecho para la industria de alimentos, materiales de embalaje y aplicaciones biomédicas y de ingeniería de tejidos.[68]

En la **Figura 21** se evidencia el fenómeno de impregnación de los flavonoides presentes en el EECC sobre los cubos de CB. Teniendo presente la estructura de la CB como polisacárido, podemos decir que la tinción de este material se puede deber a diversos tipos de interacciones: puentes de hidrógeno por los grupos –OH de los flavonoides y de los residuos glicosídicos, enlaces de hidrógeno entre los –OH de la CB y los residuos aromáticos de los flavonoides e interacciones de van der Waals. Estas mismas interacciones se han reportado entre colorantes en efluentes y polisacáridos.[69]

Analizando el tema del color, aunque las soluciones de EECC si logran impregnar los cubos de CB, se observa también que cierta parte del color original de las soluciones se pierde en el proceso, disminuyendo la eficiencia de la tinción. En general, tanto los flavonoides como las otras familias de compuestos que componen los colorantes de origen vegetal, se caracterizan por ser más lábiles e inestables que los colorantes sintéticos. En nuestro caso, se observa que la impregnación aplicando vacío al inicio del experimento, logra disminuir la presencia de O_2 en el ambiente de la tinción, disminuyendo el proceso de oxidación de los flavonoides presentes, no obstante, será útil en investigaciones posteriores, emplear otros métodos de estabilización de colorantes naturales reportados, tales como: uso de compuestos poliméricos, co-pigmentos polifenólicos (pectinas, proteínas de suero),

gomas, ciclodextrinas, iones metálicos, atmósferas controladas (exclusión de oxígeno), métodos de secado y encapsulación.[70]

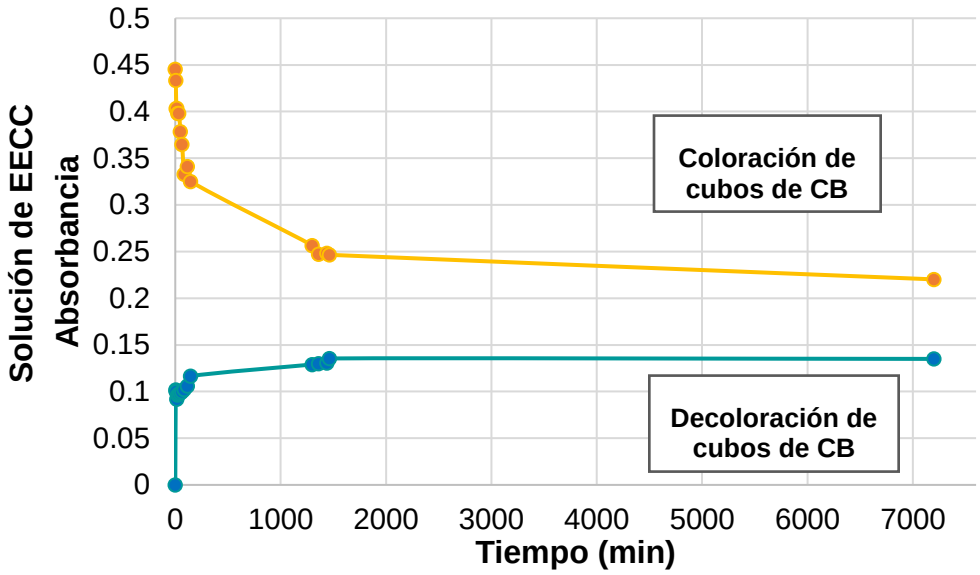
Con respecto a los porcentajes de pérdida de color, podemos decir que estos son análogos a los reportados por colorantes azoicos impregnados sobre celulosa. Shim y Kym registraron una pérdida de color del 30 % con experimentos de tinción de un tinte de antraquinona (*Reactive blue 19*) sobre CB a 135 °C por 30 minutos en una máquina cilíndrica de tinción.[71]

Por otra parte, se monitoreó para la solución de EECC Amarillo la cinética de coloración y decoloración sobre cubos de CB. En la **Figura 22** se puede observar que con el paso del tiempo, los flavonoides del EECC comienzan a unirse con los cubos de CB y después de un día tienden a alcanzar un equilibrio de saturación de color, logrando para el día 5 reducir aproximadamente a la mitad la concentración de la solución del EECC Amarillo. A su vez, se monitoreó la decoloración de los mismos cubos de CB que habían sido impregnados con la solución de EECC Amarillo, y se pudo observar en el mismo periodo de monitoreo, que toda la cantidad de flavonoides impregnados a los cubos de CB no se desorbieron, por lo que se prueba que un porcentaje del EECC se une a los cubos de CB de forma irreversible, a causa de la fortaleza de las interacciones moleculares establecidas entre los flavonoides y la CB.

---

[68] BLANCO PARTE, Francisco German, *et al*. Current Progress on the Production, Modification, and Applications of Bacterial Cellulose. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2020, vol 40, nro 3, pp 397–414.
[69] BLACKBURN, Richard. S. Natural Polysaccharides and Their Interactions with Dye Molecules: Applications in Effluent Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 2004, vol *38*, nro 18, pp 4905–4909.
[70] CORTEZ, Regina, *et al*. Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications: Stabilization of Natural Pigments. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016.
[71] Shim, E.; Kim, H. R. Coloration of Bacterial Cellulose Using in Situ and Ex Situ Methods. *Text. Res. J.* 2019, vol 89, nro 7, pp 1297–1310.

Figura 22. Cinética de coloración y decoloración de cubos de CB con solución acuosa de EECC Amarillo



FUENTE: Autor

Como segundo material de tinción, se emplearon muestras de yogurt natural las cuales fueron mezcladas con los EECC a una concentración de 10 mg de EECC/mL de yogurt y se evaluó la estabilidad del color con el tiempo.

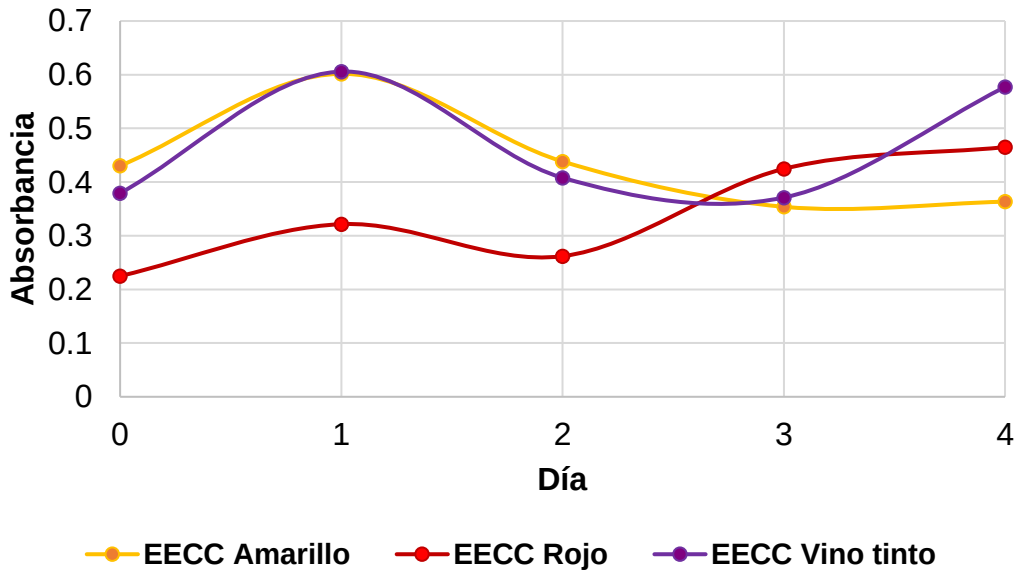
Figura 23. Muestras de yogurt coloreadas con EECC

FUENTE: Autor

En la **Figura 23** se puede observar, que las muestras de yogurt conservan mejor el color original de los extractos comparado con las soluciones acuosas de EECC, y a su vez, no se percibe un gran cambio en el color de las muestras de yogurt después de los 5 días de almacenamiento en la nevera. En la literatura hay reportes de

extractos de frutas ricos en antocianinas que han sido empleados como colorantes en muestras de yogurt.[72–74] Estas investigaciones concluyen, que la alta retención de color en las muestras de yogurt mezcladas con estos colorantes (por encima del 70%), se debe en gran medida, a la estabilización de las antocianinas a pH ácido, logrando así intensificar su color rojo dentro de las muestras.[72,73] De igual modo, se puede decir que el contenido de proteínas y grasas del yogurt puede ejercer un efecto protector sobre la fracción de flavonoides y antocianinas,[75] ralentizando así el proceso de degradación y por ende de pérdida del color en la muestra. En la **Figura 24** se monitoreó la absorbancia de las muestras de yogurt durante los 5 días de almacenamiento. Se observa una gran variabilidad debido a que se forman emulsiones al momento de diluir las muestras de yogurt para la medición en UV-Vis, sin embargo, se logra apreciar una tendencia de conservación del color para cada uno de los EECC.

Figura 24. Estabilidad del color en muestras de yogurt

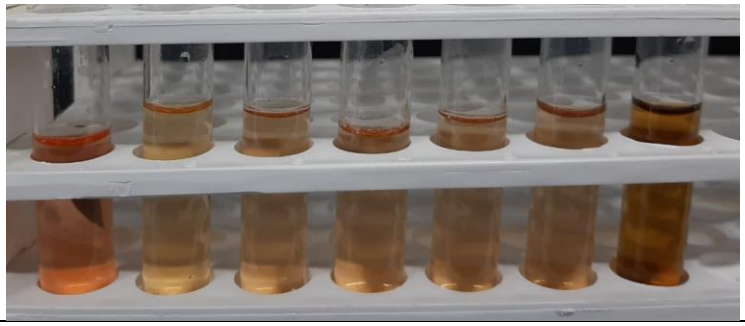


FUENTE: Autor

Por otra parte, en la **Figura 25** se registra el color de cada una de las soluciones de EECC a distinto pH (desde 1 hasta 13) evidenciando pequeñas variaciones para el EECC Amarillo y variaciones un poco más perceptibles para los EECC Rojo y Vino

tinto. Estos dos últimos extractos contienen dentro de su perfil de flavonoides moléculas de antocianinas, las cuales son estables a pH bajo, pero de las cuales se ha reportado que varían su color con el cambio de pH. Esta variación se debe a que el catión flavilio, el cual describe la estructura molecular de las antocianinas a pH ácido, se protona a medida que aumenta el pH, y esto induce a que las antocianinas adopten formas neutras o aniónicas modificando su color.[76] En nuestro caso, las mayores variaciones de color se aprecian a pH 1 y 13, sin embargo, el contenido de antocianinas no es lo suficientemente alto como para modificar en mayor orden el color de las soluciones.

Figura 25. Variación del color de los EECC a distinto pH

EECC Amarillo	
EECC Rojo	
EECC Vino tinto	
pH	**1 3 5 7 9 11 13**

FUENTE: Autor

Con el fin de conocer más información química relacionada con el color de los EECC se hicieron mediciones de reflectancia difusa. En la **Figura 26** se observan los espectros de reflectancia difusa, en los cuales se presenta una zona de mínima reflectancia entre 200 y 350 nm, lo que representa una zona de absorción para los extractos, hecho que concuerda con los dos máximos de absorción (283 nm y 323 nm) de los espectros UV-Vis observados en la **Figura 13**.

Por otra parte, en la región entre los 400 nm y 700 nm se observa una mayor banda de reflectancia para el EECC amarillo, lo que se traduce en que los EECC Rojo y Vino tinto absorben más en esa misma región. La forma de las bandas en esta región (400 - 700 nm), especialmente la del EECC Vino tinto, concuerda muy bien con los espectros de reflectancia difusa de extractos de cáscara de manzana con alto contenido de antocianinas, los cuales han sido reportados. Este hecho evidencia una vez más la presencia de antocianinas en los EECC Rojo y Vino tinto.[77]

---

[72] MERINO, Clemencia, et al. Two Extraction Methods for Natural Dyes (Anthocyanin) from Blackberries of Castilla (Rubus Glaucus Benth) and Its Application in Yogurt. *J. Food Nutr. Res.* 2018, vol 6, pp 699–705.

[73] DE CARVALHO ALVES, Ana Paula, *et al*. Flour and Anthocyanin Extracts of Jaboticaba Skins Used as a Natural Dye in Yogurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2013, vol 48, nro 10, pp 2007–2013.

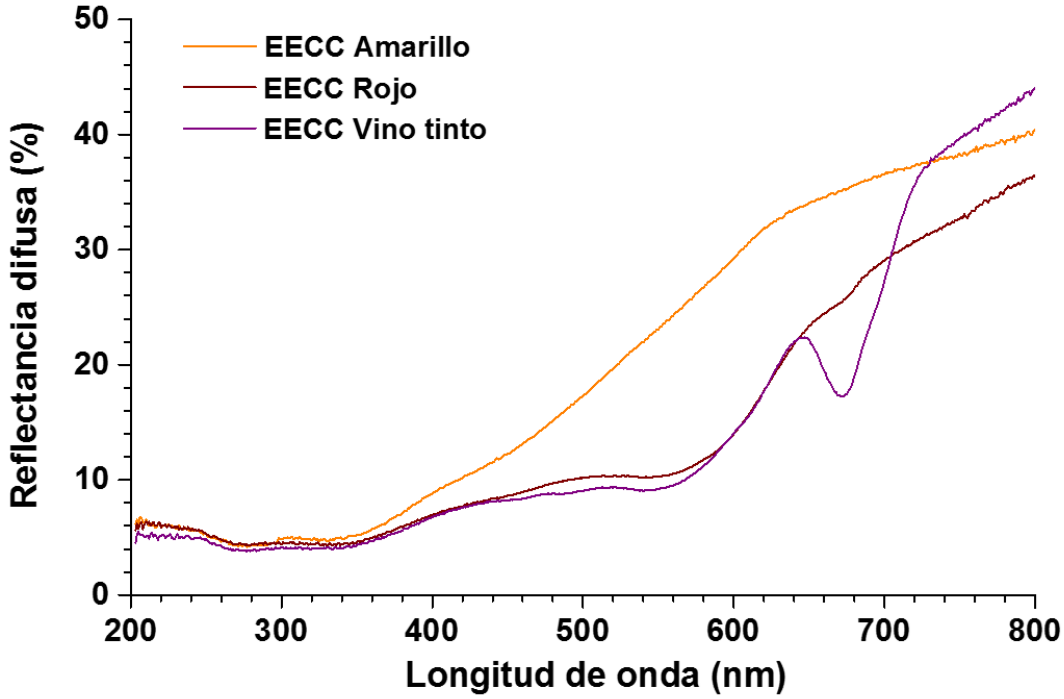
[74] WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Determination of Color, Pigment, and Phenolic Stability in Yogurt Systems Colored with Nonacylated Anthocyanins from Berberis Boliviana L. as Compared to Other Natural/Synthetic Colorants. *J. Food Sci.* 2008, vol 73, nro 4, C241–C248.

[75] JING. P; GIUSTI. MM. Characterization of Anthocyanin-Rich Waste from Purple Corncobs (Zea Mays L.) and Its Application to Color Milk. *J. Agric. Food Chem.* 2005, vol 53, nro 22, pp 8775–8781.

[76] WAHYUNINGSIH, S, et al. The Effect of PH and Color Stability of Anthocyanin on Food Colorant. *IOP Publ.* 2017, vol 193, pp 1–9.

[77] MERZLYAK, M. N.; SOLOVCHENKO, A. E.; GITELSON, A. A. Reflectance Spectral Features and Non-Destructive Estimation of Chlorophyll, Carotenoid and Anthocyanin Content in Apple Fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 2003, vol 27, nro 2, pp 197–211.

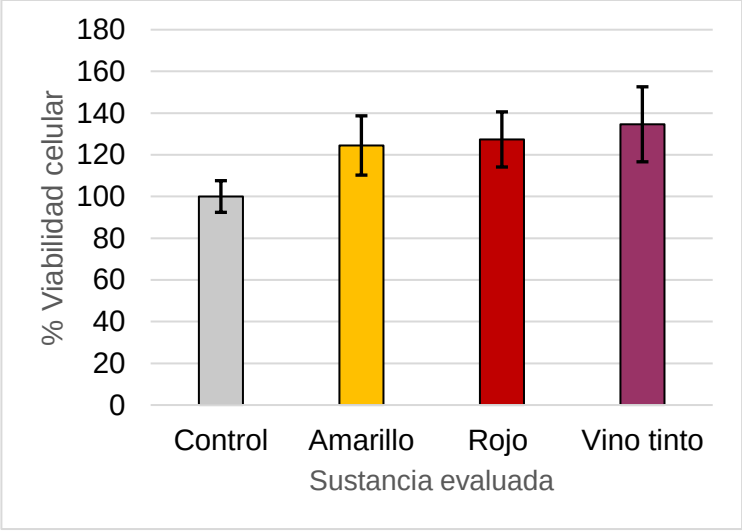
Figura 26. Espectros de reflectancia difusa de los EECC



FUENTE: Autor

4.6 EVALUACIÓN DE PROPIEDADES CITOTÓXICAS

Figura 27. Efecto de los EECC sobre la viabilidad celular de la línea celular VERO



Sustancia	% Viabilidad ± desviación estándar
Control	100.0000 ± 7,586
Vino tinto	134,634 ± 17,986
Amarillo	124,476± 14,219
Rojo	127,374 ± 13,226

FUENTE: Autor

En el ensayo de reducción de la sal de tetrazolio MTT, las deshidrogenasas de las células viables y metabólicamente activas reducen el MTT produciendo cristales de formazan, solubles en DMSO. La cantidad de formazan es directamente proporcional a la cantidad de células viables.

En la **Figura 27** se presentan los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en la exposición de células VERO a los EECC. Se puede observar que todos los EECC superan el 100 % de viabilidad celular, esto indica que los EECC como colorantes naturales no ejercen ningún efecto citotóxico sobre la línea celular VERO, por lo contrario, estimulan la proliferación y viabilidad celular dentro de la misma. Estos resultados son comparables con los reportes en la literatura, ya que tanto extractos de granos de cacao como de otras partes del fruto y de la planta de cacao (cáscara, cascarilla, hojas, raíces, etc) han mostrado actividad citotóxica moderadamente activa sobre distintas líneas celulares cancerígenas humanas (cáncer de mama, de hígado, de pulmón, cervical y carcinoma de colon).[78] En ese sentido, se puede confiar en la utilidad de los EECC como colorantes alimenticios, aunque son necesarios otras mediciones de citotoxicidad sobre líneas celulares humanas normales.

---

[78] Baharum, Zainal, *et al*. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extracts of Theobroma Cacao. *Molecules* 2014, vol 19, pp 18317–18331.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron tres extractos de epicarpio de cáscara de cacao (EECC) de colores amarillo, rojo y vino tinto empleando la extracción con disolvente asistida por ultrasonido. Los rendimientos de extracción de los EECC fueron altos (entre el 15 % y el 25 %) comparados con otras matrices vegetales y el óptimo de extracción de acuerdo al diseño experimental se obtuvo bajo las condiciones: relación EtOH:H_2O 80:20, 0 % de HCl y temperatura de 30 °C.

Se reconocieron las bandas de absorción típicas de los flavonoides en los espectros UV-Vis de los EECC, así como bandas características en los espectros de reflectancia difusa de los mismos. A su vez, se determinó el contenido de polifenoles totales en los EECC por el método de Folin-Ciocalteu, registrando una buena cantidad de polifenoles tal como se reporta en la literatura.

La espectrometría de masas MALDI-TOF mostró ser una técnica apropiada para el análisis del perfil de flavonoides de los EECC. Se identificaron en total 15 flavonoides, algunos ya reportados en cáscara, en grano de cacao o en ambos, muchos de estos comunes para los tres EECC. Aunque las tres matrices mostraron alta eficiencia para ionizar las moléculas de flavonoides en la muestra, mediante la matriz DCTB se identificó un mayor número de señales.

En general, se observó que los EECC poseen una buena capacidad para teñir cubos de celulosa bacteriana y muestras de yogurt. Las soluciones acuosas de EECC forman diversas interacciones intermoleculares que permiten unir de forma estable estos colorantes naturales con la celulosa bacteriana, tal como se comprobó con el EECC Amarillo. A su vez, se evidenció que los EECC mantienen su color en matrices o alimentos con alto contenido de grasas y proteínas, como el yogurt.

Mediante los ensayos con MTT se observó que los EECC no poseen un efecto citotóxico sobre la línea celular en la concentración y el tiempo evaluado. Esto indica en buena forma que los EECC no representan un riesgo para ser empleados como colorantes en la industria alimenticia.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda emplear otras condiciones (tiempo de extracción, mayores y menores temperaturas, etc) y metodologías de extracción (extracción con fluido supercrítico) mediante las cuales se obtengan extractos con mayor contenido polifenólico y de mejor rendimiento.

Se recomienda ampliar el set de matrices MALDI para el análisis de los flavonoides, así como el uso de varios cocientes matriz:analito y el estudio en alta resolución (MALDI-FTICR) de los extractos

Se recomienda el uso de técnicas (proteínas, exclusión de O_2, agentes estabilizantes, etc) que permitan estabilizar los flavonoides y las antocianinas en los procesos de impregnación de alimentos

Se recomienda emplear líneas celulares humanas normales (hígado y riñón) en los ensayos de MTT para garantizar con mayor eficiencia la no citotoxicidad de los EECC así como diseñar experimentos a varias concentraciones y tiempos de exposición.

BIBLIOGRAFÍA

ABBOTT, Philip, *et al*. Análisis de La Cadena Productiva Del Cacao En Colombia, 2019.

ARDILA, Carolina.; CARREÑO, Silvia. Aprovechamiento de La Cáscara de La Mazorca de Cacao Como Adsorbente, Trabajo de grado, Ingeniería Química, Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas, Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander, 2011.

AZEEZ, Shamina.; SHIVA, K. N.; VA, Parthasarathy. Food Colours of Plant Origin. *Cab Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* 2007, vol. 2.

BAHARUM, Zainal, *et al*. In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of Methanolic Plant Part Extracts of Theobroma Cacao. *Molecules*. 2014, vol. 19, pp. 18317–18331.

BARAZARTE, H.; SANGRONIS, E.; UNAI, E. Cocoa (Theobroma Cacao L.) Hulls: A Posible Commercial Source of Pectins. *Arch. Latinoam. Nutr.* 2008, vol. 58, nro. 1, pp. 64–70.

BECHTOLD, Thomas.; MUSSAK, Rita. *Handbook of Natural Colorants*; Wiley, 2009.

BELMONTE, José.; ARROY, Ismael.; VAZQUEZ, Miguel. Synthetic Dyes in Food Stuff. *Rev. Nat. y Tecnol.* 2016, vol. 10, pp. 25–38.

BETIKU, Eriola, *et al*. Two-Step Conversion of Neem (Azadirachta Indica) Seed Oil into Fatty Methyl Esters Using a Heterogeneous Biomass-Based Catalyst: An Example of Cocoa Pod Husk. *Energy & Fuels*. 2017, vol. 31.

BHATTACHARJEE, R.; LAVA KUMAR, P. Cacao. In Technical Crops. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants; *Springer*. 2007, pp. 127–142.

BLACKBURN, Richard. S. Natural Polysaccharides and Their Interactions with Dye Molecules: Applications in Effluent Treatment. *Environ. Sci. Technol.* 2004, vol. *38*, nro. 18, pp. 4905–4909.

BLANCO PARTE, Francisco German, *et al*. Current Progress on the Production, Modification, and Applications of Bacterial Cellulose. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2020, vol. 40, nro. 3, pp. 397–414.

CAMPOS-VEGA, Rocio.; NIETO-FIGUEROA, K. H.; OOMAH, B. D. Cocoa (Theobroma Cacao L.) Pod Husk: Renewable Source of Bioactive Compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 2018.

CARMONA, Iris. *De Colorantes Sintéticos a Naturales En La Industria Alimentaria*; Santiago de Chile, 2013.

CASTELLANOS-GARCÍA, Laura J, *et al*. Oligo P-Phenylenevinylene Derivatives as Electron Transfer Matrices for UV-MALDI. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2017, vol. 28, nro. 12, pp. 2548–2560.

CHEEMA, Summervir.; SOMMERHALTER, Monika. Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Ataulfo Mango. *Food Chem.* 2015, vol. 171, pp. 382–387.

COLOMBIA: BALANCE 2018 Y PERSPECTIVAS 2019, 2018.

CONTRERAS, Carlos. Análisis de La Cadena de Valor Del Cacao En Colombia: Generación de Estrategias Tecnológicas En Operaciones de Cosecha y Poscosecha, Organizativas, de Capacidad Instalada y de Mercado, Universidad Nacional de Colombia, 2017.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects and Dietary Sources. *J. Nutr. Biochem.* 1996, vol. 7, pp. 66–76.

CORTEZ, Regina, *et al*. Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications: Stabilization of Natural Pigments. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2016.

DE CARVALHO ALVES, Ana Paula, *et al*. Flour and Anthocyanin Extracts of Jaboticaba Skins Used as a Natural Dye in Yogurt. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2013, vol. 48, nro. 10, pp. 2007–2013.

DÍAZ, Luis. Identificación de Biomarcadores Fitoplanctónicos Utilizando Espectrometría de Masas MALDI TOF Con Matrices de Transferencia Electrónica, Trabajo de Investigación, Facultad de Ciencias, Escuela de Química, Bucaramanga, Universidad Industrial de Santander, 2019.

DOWNHAM, Alison.; COLLINS, Paul. Coloring Our Foods in the Last and next Millenium. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2000, vol. 35, pp. 5–22.

ECONOMÍA NACIONAL, [Consulta: 9 de septiembre, 2019]. Disponible en www.fedecacao.com

FEDECACAO. Datos Economía Nacional, 2020.

FEDERACIÓN NACIONAL DE CACAOTEROS FONDO DE ESTABILIZACIÓN DE PRECIOS DEL CACAO - FEP CACAO. Informe de Gestión Año 2017 Fondo de Estabilización de Precios Del Cacao – FEP CACAO, Bogotá, 2018.

GERLIER, Denis.; THOMASSET, Nicole. Use of MTT Colorimetric Assay to Measure Cell Activation. *J. Immunol. Methods*. 1986, vol. 94, nro. 1, pp. 57–63.

GIACOMETTI, Jasminka.; JOLIĆ, S.; JOSIC, D. Cocoa Processing and Impact on Composition. In *Processing and Impact on Active Components in Food*. 2015, pp. 605–612

GROSS, Jurgen. Mass Spectrometry, ed 1; *Springer*, 2004.

GROTEWOLD, Erich., The Science of Flavonoids, ed 1.; *Springer-Verlag New York*, 2006.

GUARATINI, Thais, *et al*. Application of Matrix-Assisted Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight LIFT for Identification of Cocoa Condensed Tannins. *J. Mass Spectrom.* 2014, vol. 49, pp. 251–255.

HERRERA, M. C.; LUQUE DE CASTRO, M. D. Ultrasound-Assisted Extraction for the Analysis of Phenolic Compounds in Strawberries. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, vol. 379, nro. 7–8, pp. 1106–1112.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION (ICCO).Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, 2010.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION. (ICCO). May 2020 Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics, 2020.

IUPAC. COMPENDIUM OF CHEMICAL TERMINOLOGY, Ed 2.; McNaught, A. D., Wilkinson, A., Eds.; Blackwell Scientific Publications, 1997.

JING. P; GIUSTI. MM. Characterization of Anthocyanin-Rich Waste from Purple Corncobs (Zea Mays L.) and Its Application to Color Milk. *J. Agric. Food Chem.* 2005, vol. 53, nro. 22, pp. 8775–8781.

KARBACH, Volker.; KNOCHENMUSS, Richard. Do Single Matrix Molecules Generate Primary Ions in Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998, vol. 12 nro. 14, pp. 968–974.

KARIM, Azila, *et al*. Phenolic Composition, Antioxidant, Anti-Wrinkles and Tyrosinase Inhibitory Activities of Cocoa Pod Extract. *BMC Complement. Altern. Med.* 2014, vol. 14, p. 381.

KUMI, Winifred, *et al*. A Manual for Extraction of Cocoa Potash and Production of Cocoa Soft Soap; *Cocoa Research Institute of Ghana*: Ghana, 2012.

LACONI, Erika. B.; Jayanegara, ANURAGA. Improving Nutritional Quality of Cocoa Pod (Theobroma Cacao) through Chemical and Biological Treatments for Ruminant Feeding: In Vitro and In Vivo Evaluation. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 2015, vol. 28, nro. 3, pp. 343–350.

LATEEF, Agbaje, *et al*. Cocoa Pod Husk Extract-Mediated Biosynthesis of Silver Nanoparticles: Its Antimicrobial, Antioxidant and Larvicidal Activities. *J. Nanostructure Chem.* 2016, vol. 6, pp. 159–169.

LOCK, Olga. *Colorantes Naturales*, ed 1.; Fondo Editorial PUCP, Ed.; Lima, 1997.

MANSUR, Dieni, *et al*. Conversion of Cacao Pod Husks by Pyrolysis and Catalytic Reaction to Produce Useful Chemicals. *Biomass and Bioenergy*, 2014, vol. 66.

MARKHAM KEN. R.and MABRY, Tom. J. Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. *Springer US*: Boston, MA. 1975, pp. 45–77.

MARTÍNEZ ESPINOSA, Ruth, *et al*. Chemical, Technological and in Vitro Antioxidant Properties of Cocoa (Theobroma Cacao L.) Co-Products. *Food Res*. Int.

2012, vol. 49, pp. 39–45. TORRES-MORENO, Miriam, *et al*. Nutritional Composition and Fatty Acids Profile in Cocoa Beans and Chocolates with Different Geographical Origin and Processing Conditions. *Food Chem.* 2014, vol. 166, pp. 125–132.

MASHUNI; Hamid, *et al*. The Determination of Total Phenolic Content of Cocoa Pod Husk Based on Microwave-Assisted Extraction Method, 2020; p. 030013.

MCCARLEY, Tracy. Donovan.; MCCARLEY, Robin. L.; LIMBACH, Patrick. A. Electron-Transfer Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 1998, vol. 70, nro. 20, pp. 4376–4379.

MEJÍA, Luis.; ARGUELLO, Orlando. Tecnología Para El Mejoramiento Del Sistema de Producción de Cacao; *Corpoica*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria: Bucaramanga, 2000.

MERINO, Clemencia, et al. Two Extraction Methods for Natural Dyes (Anthocyanin) from Blackberries of Castilla (Rubus Glaucus Benth) and Its Application in Yogurt. *J. Food Nutr. Res.* 2018, vol. 6, pp. 699–705.

MERZLYAK, M. N.; SOLOVCHENKO, A. E.; GITELSON, A. A. Reflectance Spectral Features and Non-Destructive Estimation of Chlorophyll, Carotenoid and Anthocyanin Content in Apple Fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 2003, vol. 27, nro. 2, pp. 197–211.

MUNOZ-BERNAL, Oscar, *et al*. Nuevo Acercamiento a La Interacción Del Reactivo de Folin-Ciocalteu Con Azúcares Durante La Cuantificación de Polifenoles Totales. *TIP Rev. Espec. en Ciencias Químico-Biológicas* 2017, vol. 20, nro. 23.

NEVEU, V, *et al*. Phenol-Explorer: An Online Comprehensive Database on Polyphenol Contents in Foods. 2010.

ODDOYE, Emmanuel.; M.PHIL, Christian.; GYEDU-AKOTO, Esther. Cocoa and Its By-Products: Identification and Utilization. In Chocolate in Health and Nutrition; 2013; pp. 23–37.

ORTIZ, Kely.; ÁLVAREZ, Ricardo. Efecto Del Vertimiento de Subproductos Del Beneficio de Cacao (Theobroma Cacao L.) Sobre Algunas Propiedades Químicas y Biológicas En Los Suelos de Una Finca Cacaotera, Municipio de Yaguará (Huila, Colombia). *Boletín Científico. Cent. Museos. Mus. Hist. Nat.* 2015, vol. 19, nro. 1, pp. 65–84.

PARRA, Verónica. Estudio Comparativo En El Uso de Colorantes Naturales y Sintéticos En Alimentos, Desde El Punto de Vista Funcional y Toxicológico, Universidad Austral de Chile, 2004.

PROCOLOMBIA. Cacao y sus derivados. www.procolombia.com (accessed Oct 22, 2019).

PRODUMEDIOS: BOGOTÁ, Caracterización Fisicoquímica y Beneficio Del Grano de Cacao (Theobroma Cacao L.), 2005.

RAMIREZ, Juan.; BLANCO, Cristian.; COMBARIZA, Marianny. Electron-Transfer Ionization of Nanoparticles, Polymers, Porphyrins, and Fullerenes Using Synthetically Tunable α-Cyanophenylenevinylenes as UV MALDI-MS Matrices. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2019, vol. 11, nro. 11, pp. 10975–10987.

RISS, Terry.; NILES, Andrews.; MINOR, Lisa. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. *Assay Guid. Man.* 2004, pp. 1–23.

RODRÍGUEZ, Yelko, *et al*. Fast Analysis of Polyphenols and Alkaloids in Cocoa-Based Products by Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Orbitrap High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap-MS/MS). *Food Res. Int.* 2018, vo.l 111, pp. 229–236.

SÁNCHEZ, Ferran, *et al*. Liquid Chromatographic/Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric Study of the Phenolic Composition of Cocoa (Theobroma Cacao). *J. Mass Spectrom.* 2003, vol. 38, pp. 35–42.

Santana, N. B.; Dias, J. C. T.; Rezende, R. P.; Franco, M.; Oliveira, L. K. S.; Souza, L. O. Production of Xylitol and Bio-Detoxification of Cocoa Pod Husk Hemicellulose Hydrolysate by Candida Boidinii XM02G. *PLoS One* 2018, vol. 1, nro. 4.

SANTOS, Erica, *et al*. Flavonoids: Classification, Biosynthesis and Chemical Ecology; 2017.

Shim, E.; Kim, H. R. Coloration of Bacterial Cellulose Using in Situ and Ex Situ Methods. *Text. Res. J.* 2019, vol. 89, nro. 7, pp. 1297–1310.

SIGURDSON, Gregory.; TANG, Peipei.; GIUSTI, M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2017, vol. 8.

TORO-URIBE, Said, *et al*. Characterization of Secondary Metabolites from Green Cocoa Beans Using Focusing-Modulated Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2018, vol. 1036, pp. 204–213.

TORO-URIBE, Said, *et al.* Insight of Polyphenol Oxidase Enzyme Inhibition and Total Polyphenol Recovery from Cocoa Beans. *Antioxidants* 2020, vol. 9, nro. 6, p. 458.

VALADEZ-CARMONA, Lourdes, *et al*. Effects of Microwaves, Hot Air and Freeze-Drying on the Phenolic Compounds, Antioxidant Capacity, Enzyme Activity and Microstructure of Cacao Pod Husks (Theobroma Cacao L.). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2017, vol. 41, pp. 378–386.

VALADEZ-CARMONA, Lourdes, *et al*. Valorization of Cacao Pod Husk through Supercritical Fluid Extraction of Phenolic Compounds. *J. Supercrit. Fluids*. 2017, vol. 131.

VASIL'EV, Y. V, *et al*. Electron Transfer Reactivity in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI): Ionization Energy, Electron Affinity and Performance of the DCTB Matrix within the Thermochemical Framework. *J. Phys. Chem. A* 2006, vol. 110, nro. 18, pp 5967–5972.

WAHYUNINGSIH, S, et al. The Effect of PH and Color Stability of Anthocyanin on Food Colorant. *IOP Publ.* 2017, vol. 193, pp. 1–9.

WALLACE, T. C.; GIUSTI, M. M. Determination of Color, Pigment, and Phenolic Stability in Yogurt Systems Colored with Nonacylated Anthocyanins from Berberis Boliviana L. as Compared to Other Natural/Synthetic Colorants. *J. Food Sci.* 2008, vol. 73, nro. 4, C241–C248.

WANG, J.; KALT, W.; SPORNS, P. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS Analysis of Anthocyanins in Highbush Blueberries. *J. Agric. Food Chem.* 2000, vol. 48 nro. 8, pp. 3330–3335.

WINKEL-SHIRLEY, Brenda. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiol.* 2001, vol. 126, nro. 2, p 485.

WINKEL-SHIRLEY, Brenda. Flavonoid Biosynthesis: ‘New’ Functions for an ‘Old’ Pathway. *Trends Plant Sci.* 1996, vol. 1, nro. 11, pp. 377–382.

WOLLGAST, Jan.; ANKLAM, Elke. Review on Polyphenols in Theobroma Cacao: Changes in Composition during the Manufacture of Chocolate and Methodology for Identification and Quantification. *Food Res. Int.* 2000, vol. 33, nro. 6, pp. 423–447.

YUSOF, A, *et al*. Optimization of an Ultrasound-Assisted Extraction Condition for Flavonoid Compounds from Cocoa Shells (Theobroma Cacao) Using Response Surface Methodology. *Molecules* vol. 24, nro. 4.

ZAPATA, Luz. Obtención de Extracto de Antocianinas a Partir de Arándanos Para Ser Utilizado Como Antioxidante y Colorante En La Industria Alimentaria, Universidad Politécnica de Valencia, 2014.