

**DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL Y MODELAMIENTO DE LOS PERFILES  
DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS A PARTIR DE CÁSCARA DE CACAO (CLON CCN-51)**

**LUISA FERNANDA PÉREZ LAYTÓN  
NATALIA SOFÍA PULIDO MOLANO**

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

**2014**

**DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL Y MODELAMIENTO DE LOS PERFILES  
DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS  
BIOACTIVOS A PARTIR DE CÁSCARA DE CACAO (CLON CCN-51)**

**LUISA FERNANDA PÉREZ LAYTÓN  
NATALIA SOFÍA PULIDO MOLANO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Ingeniera Química**

**Director:  
LUIS JAVIER LÓPEZ GIRALDO  
Ingeniero Químico, Ph.D.**

**Codirectora:  
YEIMY MABEL MARTÍNEZ TRIANA  
Ingeniera Química**

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

**2014**

*Dedicado a mis padres Silvestre y Carmen porque son el motor que me impulsan, ya que sin sus enseñanzas, su amor día a día y su esfuerzo por que saliera adelante no fuese la mujer que soy hoy en día.*

*A mis hermanos Edgar y Manuel por su incondicional apoyo, por cuidarme y por estar ahí siempre presentes en las buenas y en las malas.*

*A mi novio Duvan por brindarme su amor, su compañía, apoyo y paciencia durante este tiempo juntos.*

*A mi compañera Sofía porque fue la hermana de travesuras durante parte de la carrera y a lo largo de esta aventura.*

*A mis amigos que estuvieron apoyándome y con quienes compartí muchas alegrías y tristezas.*

*LUISA FERNANDA PÉREZ L.*

*Dedico este trabajo a Dios por ser mi guía y protector,  
por darme una familia tan hermosa,  
por darme fortaleza y sabiduría para entender su voluntad,  
sin él nada de esto hubiese sido posible*

*NATALIA SOFÍA PULIDO MOLANO*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de la Universidad Industrial de Santander por el apoyo económico recibido a través del proyecto interno VIE-5466 titulado: “Ajuste matemático de la solubilidad de polifenoles en dióxido de carbono supercrítico y etanol aplicado a los residuos agroindustriales de la cadena cacao-chocolate”.

Al Instituto de Biotecnología y Agroindustria (IBA) de la Universidad Nacional de Colombia (sede Manizales) por la disposición de sus instalaciones, préstamo de equipos y a sus integrantes por el acogimiento y apoyo recibido.

Al Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) y al Laboratorio de Procesos de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander, por el acogimiento y apoyo recibido, además por la disposición de sus instalaciones y préstamo de equipos.

Al Centro de Investigaciones en Catálisis CICAT de la Universidad Industrial de Santander, por la disposición de equipos.

Al Dr. Luis Javier López Giraldo, director de esta investigación por su orientación, acompañamiento y apoyo a lo largo de este proceso. Gracias por acogernos y brindarnos sus conocimientos.

Al Dr. Arlex Chaves Guerrero, por su valiosa orientación y paciencia.

A la Ing. Yeimy Mabel Martínez Triana por sus enseñanzas e incondicional apoyo a lo largo de esta investigación. Gracias por su confianza, paciencia y por brindarnos su amistad.

**A Dios por la experiencia vivida y porque este trabajo deja muchos recuerdos, anécdotas y amigos.**

## TABLA DE CONTENIDO

Página

<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>1. METODOLOGÍA.....</b>	<b>25</b>
1.1. REACTIVOS	25
1.2. EQUIPOS Y ACCESORIOS	25
1.3. RECOLECCIÓN, ACONDICIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO	26
1.4. EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA	27
1.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LOS PSEUDOCOMPONENTES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS	29
1.6. FORMULACIÓN Y DESARROLLO DEL MODELO MATEMÁTICO	31
1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
<b>2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
2.1. CONTENIDO DE FLAVAN-3-OLE, POLIFENOLES Y CAROTENOIDES TOTALES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO MATRIZ-FSC	36
2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO	39
2.3. AJUSTE DEL MODELO MATEMÁTICO PARA DESCRIBIR LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA DE CÁSCARA DE CACAO	41
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>44</b>
<b>RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS.....</b>	<b>45</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Secuencia metodológica .....	25
<b>Figura 2.</b> Montaje experimental del equipo de fluidos supercríticos .....	28
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica del sistema de extracción (cáscara de cacao + CO <sub>2</sub> -sc + etanol) .....	31
<b>Figura 4.</b> Variación del rendimiento y contenido de flavan-3-oles (CFT), polifenoles (CPT) y carotenoides (CCT) totales en función del tiempo de contacto matriz- FSC .....	36
<b>Figura 5.</b> Comparación del rendimiento de extracción obtenido a partir de diferentes matrices .....	38
<b>Figura 6.</b> Comportamiento de la capacidad antioxidante (valor ORAC) de los extractos en función del tiempo de contacto matriz-FSC. ....	39
<b>Figura 7.</b> Perfiles experimentales y descritos por el modelo para el contenido de flavan-3-oles (CFT), polifenoles (CPT) y carotenoides (CCT) totales en función del tiempo de contacto matriz-FSC.....	43

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1</b> Clasificación de modelos .....	23
<b>Tabla 2</b> Composición de la cáscara de cacao (clon CCN-51). .....	35
<b>Tabla 3.</b> Comparación de la capacidad antioxidante (valores ORAC) para extractos obtenidos en medio supercrítico.....	40
<b>Tabla 4.</b> Parámetros característicos del sistema de extracción.....	41
<b>Tabla 5.</b> Coeficientes de transferencia de masa estimados para diferentes sistemas.....	42

## LISTA DE ANEXOS

	Página
<b>Anexo A.</b> Estructuras representativas de algunos polifenoles y carotenoides .....	<b>54</b>
<b>Anexo B.</b> Curva de secado de la cáscara de cacao (clon CC-51).....	<b>55</b>
<b>Anexo C.</b> Protocolos de caracterización física y química.....	<b>56</b>
<b>Anexo D.</b> Curvas de calibración .....	<b>58</b>
<b>Anexo E.</b> Algoritmo de cálculo implementado para resolver el modelo.....	<b>60</b>
<b>Anexo F.</b> Rendimientos de extracción, contenido de polifenoles, flavan-3-oles y carotenoides totales, y valores ORAC cuantificados en los extractos .....	<b>61</b>

## NOMENCLATURA

A	Área superficial
Abs	Absorbancia
AARD	Desviación absoluta relativa promedio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>2</sub> - sc	Dióxido de carbono supercrítico
C <sub>0</sub>	Concentración inicial de soluto en la partícula
C <sub>sln</sub>	Concentración de soluto acumulado en el FSC en función del tiempo
C <sub>sol</sub>	Solubilidad del soluto en el FSC
C <sub>sto</sub>	Concentración de soluto en la partícula
CPT	Contenido de polifenoles totales
CFT	Contenido de flavan-3-oles totales
CCT	Contenido de carotenoides totales
D <sub>e</sub>	Coeficiente de difusión efectiva del soluto en el FSC
EAG	Equivalente de Ácido Gálico
EEP	Equivalente de (-)-epicatequina
EBC	Equivalente de β-caroteno
ET	Equivalente de Trolox
EL	Extracto liofilizado
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSC	Fluido supercrítico
F <sub>partícula</sub>	Flux desde la partícula
F <sub>FSC</sub>	Flux en la mezcla CO <sub>2</sub> -sc + etanol
K <sub>T</sub>	Coeficiente de transferencia de masa del soluto a través del FSC
ORAC	Oxygen radical absorbance capacity
P	Presión
r	Radio de la partícula
r <sub>p</sub>	Radio de la partícula a través del tiempo
T	Temperatura
V <sub>sln</sub>	Volumen de la solución

## RESUMEN

**TÍTULO:** DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL Y MODELAMIENTO DE LOS PERFILES DE EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE CÁSCARA DE CACAO (CLON CCN-51)\*

**AUTOR:** Luisa Fernanda Pérez Laytón, Natalia Sofía Pulido Molano.\*\*

**PALABRAS CLAVE:** extracción supercrítica, residuos agroindustriales, cáscara de cacao, modelamiento, antioxidante

### DESCRIPCIÓN:

En este trabajo se estudió experimentalmente el comportamiento de la extracción supercrítica de compuestos bioactivos en términos del contenido de polifenoles (CPT), flavan-3-oles (CFT) y carotenoides totales (CCT), así como la evolución de la capacidad antioxidante en función del tiempo de contacto entre la cáscara de cacao y el fluido supercrítico (CO<sub>2</sub>-sc + etanol) en modo semi-continuo. Las extracciones se realizaron a 313,15 K, 20 MPa, y 20% de etanol con muestreos entre los 600 y 14400 s de contacto. En todos los casos, el CPT, CFT y CCT se cuantificaron por espectrofotometría UV-vis, mientras que la capacidad antioxidante se determinó con el método ORAC hidrofílico. Los extractos exhibieron en promedio un CPT de 20,45 mgEAG/gEL, CFT de 9,40 mgEEP/gEL, CCT de 44,95 mgEBC/gEL y una capacidad antioxidante de 439,98 ± 6,50 μmolET/ gEL. El proceso fue modelado a través de un balance diferencial de masa, el cual logró describir el comportamiento de los perfiles de extracción con una desviación absoluta relativa promedio (AARD(%)) menor al 30,8 % para los polifenoles, 21,1 % para los flavan-3-oles y 47,1 % para los carotenoides. Finalmente, el coeficiente de transferencia de masa ( $K_T$ ) estimado para los flavan-3-oles mostró ser un orden de magnitud menor que el obtenido para polifenoles y carotenoides. Lo anterior permite sugerir que los flavan-3-oles logran transferirse en menor tiempo hacia la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol.

---

\*Trabajo de grado

\*\*Facultad de Ingenierías Físicoquímicas, Escuela de Ingeniería Química, Universidad Industrial de Santander, Director: Ph.D. Luis Javier López Giraldo, Codirectora: Ing. Yeimy Mabel Martínez Triana.

## ABSTRACT

**TITLE:** EXPERIMENTAL DETERMINATION AND MODELING PROFILES FOR OBTAINING SUPERCRITICAL EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM CACAO HUSKS (CLON CCN-51)\*

**AUTHOR:** Luisa Fernanda Pérez Laytón, Natalia Sofía Pulido Molano.\*\*

**KEYWORDS:** supercritical extraction, agricultural waste, cacao husks, modeling, antioxidant

### DESCRIPTION:

The goal of this work was study experimentally the behavior of supercritical extraction of bioactive compounds in terms of its polyphenol content (TPC), flavan-3-ols (CFT), total carotenoids (CCT), and the evolution of antioxidant capacity as a function of contact time between the cacao husks and supercritical fluid (CO<sub>2</sub>-sc + ethanol) in semi-batch mode. The extractions were performed at 313.15 K, 20 MPa, and 20% ethanol, in a time range between 600 and 14400 s. In all cases, the CPT, CFT, CCT were evaluated by using spectrophotometry UV-vis and the antioxidant capacity was determined with the hydrophilic-ORAC assay. The extracts showed a CPT of 20.45 mgGAE/gLE, CFT of 9.40 mgEPE/gLE, CCT of 44.95 mgBCE/gLE and antioxidant capacity of 439.98 ± 6.50 μmolTE/ gLE. The experimental data were correlated using a model based on differential mass balance equation, which describe this behavior with on average absolute relative deviation (AARD (%)) less than 30.8% for the polyphenols, 21.1% for flavan-3-ols, and 47.1% for carotenoids. Finally, the mass transfer coefficient ( $K_T$ ) estimated for flavan-3-ols are an order less than for polyphenols and carotenoids. This result suggests that the flavan-3-ols are transferred to the FSC in less time, compared to the others.

---

\* Undergraduate Project

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Universidad Industrial de Santander. Advisor: Ph.D. Luis Javier López Giraldo. Co-advisor: Ing. Yeimy Mabel Martínez Triana.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años se está evidenciando una creciente demanda de productos y aditivos de origen natural con propiedades antioxidantes, funcionales y nutracéuticas. En este contexto, Colombia alberga más de 56000 especies de plantas (Romero *et al.*, 2008) con un considerable contenido de metabolitos secundarios de gran potencial para la industria. En general, a nivel nacional el sector con mayor investigación en el tema de ingredientes naturales es el alimenticio, seguido del farmacéutico y cosmético (López *et al.*, 2009). No obstante, en términos de mercado, las mayores oportunidades de crecimiento se perfilan para los cosméticos, identificados como uno de los tres sectores de clase mundial del país (MinCIT, 2012; La República, 2013). Por lo tanto, en respuesta a esta tendencia, varias investigaciones nacionales se han venido enfocando en la obtención de extractos naturales con una alta concentración de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante, variadas propiedades funcionales, gran inocuidad y libres de trazas de solventes.

Dentro de los antioxidantes naturales más estudiados para aplicaciones industriales se encuentran los polifenoles y carotenoides. Los polifenoles se caracterizan por poseer varios grupos hidroxilo (OH) alrededor de los anillos aromáticos que los constituyen (Bravo *et al.*, 1998), los cuales le confieren el poder de ser neutralizadores eficaces de radicales hidroxilo y peroxilo, y del anión superóxido (Cadenas & Packer, 2002). Se estima que existen más de 8000 estructuras polifenólicas, las cuales se clasifican en flavonoides y no flavonoides (para efectos ilustrativos, en el **Anexo A** se presentan algunas de sus estructuras). Los flavonoides son el subgrupo más importante de compuestos polifenólicos, y pueden encontrarse en varias formas estructurales tales como: flavanonas, flavan-3-oles, flavonas, flavonoles y antocianinas. La mayoría de ellos tienen en su estructura básica 15 átomos de carbono organizados en configuración C6-C3-C6. Por otro lado, los no

flavonoides, suelen estar representados por ácidos fenólicos simples como el ácido gálico, cinámico, protocatéquico y sus derivados (Simoes *et al.*, 1999).

Asimismo, los carotenoides son tetraterpenos (C<sub>40</sub>) contruidos a partir de ocho unidades isoprenoides (C<sub>5</sub>) y reconocidos como los principales precursores de la Vitamina A. Una característica inherente de estos compuestos se basa en su extenso sistema de dobles enlaces conjugados, los cuales sirven como cromóforos absorbentes de luz y son responsables de la coloración que presentan algunos alimentos. Estos enlaces también se han relacionado con su capacidad antioxidante al reconocerse como estructuras clave para la inactivación de radicales libres (Olson, 1999; Sies & Stahl, 1995). Hasta el momento se han identificado más de 500 carotenoides, entre los que pueden nombrarse los carotenos, licopenos, xantinas, entre otros (Rodríguez-Amaya, 2001) (para efectos ilustrativos, en el **Anexo A** se presentan algunas de sus estructuras).

La amplia variedad y disponibilidad de estos compuestos se reporta no sólo en frutas, hortalizas, cereales y algas marinas, sino también, en diversos tipos de biomasa residual (tales como: hojas, tallos, cascarillas, entre otros; Moure *et al.*, 2001; Balasundram *et al.*, 2006). Lo anterior brinda la posibilidad de convertir los residuos derivados de algunas actividades agrícolas en fuentes aprovechables de compuestos naturales. En este sentido, el gran volumen de desechos y residuos generados tras el procesamiento de productos Colombianos como el café, la caña de azúcar, el mango, el banano, la mora y el cacao, podrían considerarse el punto de partida para atender la demanda de productos naturales, generando a la vez perspectivas de desarrollo agroindustrial.

En particular, el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia se ha establecido en cerca de 147000 hectáreas, dentro de las cuales, 90000 están ocupadas con cacao común e híbrido y cerca de 30000 con materiales clonados (Perea-Villamil *et al.*, 2013). Entre 2002 y 2012, la Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia

(FEDECACAO) evaluó cerca de 500 árboles, seleccionando 67 clones promisorios, entre los que se encuentra el CCN-51 (Colección Castro Naranjal, variedad ICS 95\*IMC 67, origen ecuatoriano; [Sierra & Peñaranda, 2013](#)). Este clon se ha destacado por ofrecer altos rendimientos, ser tolerante a las enfermedades y proveer granos homogéneos. En consecuencia, su cultivo se ha extendido a través del territorio Colombiano, desplazando a variedades tradicionales ([Monsalve, 2005](#)).

El principal componente aprovechable del árbol de cacao es su grano, destinado especialmente a procesos de manufactura y chocolatería. Es por esto que ante la ausencia de alternativas que promuevan la utilización de los demás componentes del fruto (e.g. mucílago, cáscara y cascarilla), la mayoría de ellos son desechados y calificados como residuos vegetales, alcanzando volúmenes de hasta 30000 toneladas anuales ([Jaimes & Aranzazu, 2010](#)). Generalmente, estos desechos son apilados cerca a los cultivos y muchas veces generan la proliferación de enfermedades debido a su descomposición ([Barazarte et al., 2008](#)).

La cáscara de cacao, es una matriz que se caracteriza por ser rica en agua (75,3%, [Lim, 2012](#)), fibra dietaria (9,6% insoluble y 27% soluble, [Vriesmann et al., 2011](#)), azúcares (15,7% glucosa, 8,7% arabinosa, 3,9% galactosa, 2,08% xilosa, 0,17% ramnosa, [Bohenví & Benería, 1998](#)), lípidos (1,5%, [Vriesmann et al., 2011](#)), macronutrientes (2,89%, entre los que se incluyen: Ca, Fe, K, Mg y Na, [Vriesmann et al., 2011](#)), micronutrientes (1%, entre los que se encuentran: Cu, Mn, Se y Zn, [Vriesmann et al., 2011](#)), y algunos compuestos bioactivos, entre los que pueden destacarse: metilxantinas, polifenoles, taninos, pigmentos y constituyentes volátiles ([Lim, 2012](#); [Bohenví & Benería, 1998](#); [Unten et al., 1991](#)). Las anteriores características han promovido su uso en procesos con aplicaciones: *i*) alimenticias: como fuente de pectinas ([Vriesmann et al., 2011](#)) y base para alimentos de consumo animal, *ii*) energía y biocombustibles: producción de azúcares fermentables a partir de sus hidrolizados, y *iii*) medio ambiente: obtención de capas

adsorbentes que remuevan las sustancias contaminantes presentes en fuentes hídricas (Sajab *et al.*, 2013).

No obstante, pese a la reportada existencia de compuestos polifenólicos y algunos pigmentos, la ausencia de procesos que visen a la extracción de estos metabolitos a partir de cáscara de cacao tiende a ser notoria. Lo anterior evidencia la necesidad de implementar una técnica de extracción que permita su recuperación sin alterar sus características organolépticas y funcionales.

Para la obtención de estos compuestos, la literatura reporta una gran variedad de métodos de extracción convencionales como la extracción sólido-líquido y la hidrodestilación (Lang & Wai, 2001). Otras técnicas novedosas incluyen: la extracción asistida por ultrasonido o microondas y la extracción acelerada con disolventes (Wang & Weller, 2006). Estas técnicas han sido ampliamente usadas en la industria, sin embargo, su uso presenta importantes restricciones debido a la presencia de residuos de solventes tóxicos en los extractos y de compuestos indeseables en el producto final (Mendiola *et al.*, 2007; Dinc., *et al.*, 2005).

Por lo tanto, en las dos últimas décadas se está identificando una creciente demanda de tecnologías ecológicas para la extracción y procesamiento de estos compuestos, generándose un gran interés en la extracción supercrítica (Herrero *et al.*, 2010). De manera general, esta técnica es considerada un proceso análogo a la lixiviación o extracción sólido-líquido y se caracteriza porque el solvente empleado, se encuentra a condiciones de presión y temperatura mayores a las de su punto crítico (Rosa *et al.* 2009). A estas condiciones, todos los fluidos poseen propiedades fisicoquímicas, termodinámicas y de transporte que son intermedias entre aquellas de los líquidos y gases, favoreciendo los procesos de transferencia de masa.

El fluido supercrítico (FSC) que más se emplea en la actualidad, es el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>-sc). Éste se caracteriza por ser un solvente económico, no inflamable

y poseer condiciones críticas de presión y temperatura ( $P_c$ : 7,38 MPa,  $T_c$ : 304,15 K) que pueden ser alcanzadas con las tecnologías disponibles hoy en día. Asimismo su uso ha sido reconocido como seguro por la *Food and Drug Administration* (FDA) y la *European Food Safety Authority* (EFSA) (Herrero *et al.*, 2010). Sin embargo, la naturaleza apolar del  $\text{CO}_2$ -sc le proporciona un poder de solvatación débil *vis a vis* de moléculas polares como los polifenoles, haciéndose necesaria la adición de cosolventes polares como el etanol; el cual en concentraciones mínimas, es capaz de promover un incremento significativo tanto en su polaridad como en su poder de solvatación (Rosa *et al.*, 2009). Generalmente, el resultado final de este proceso es un extracto libre de solventes, debido a que el  $\text{CO}_2$ -sc es eliminado durante la despresurización, mientras que las pequeñas trazas de etanol pueden ser retiradas por evaporación atmosférica o al vacío (Díaz *et al.*, 2006).

La propiedad más influyente en todo proceso de extracción supercrítica es la densidad del FSC. Se ha encontrado que los incrementos en la presión del sistema de extracción logran generar aumentos en la densidad, los cuales a su vez se traducen en una mayor solubilización de compuestos (Mukhopadhyay, 2000). Las presiones de operación más frecuentes oscilan entre los 10 y 80 MPa (de Melo *et al.*, 2014). No obstante, en la mayoría de estudios, la presión de experimentación suele verse limitada por la ausencia de equipos capaces de operar por encima de los 30 MPa (King, 2014). Por otro lado, los aumentos en la temperatura pueden originar una disminución en la densidad y en la cantidad de compuestos solubilizados. La mayoría de trabajos se realizan a temperaturas de 313,15 K con el fin de explorar el impacto de la presión y evitar la degradación térmica de algunos compuestos extraíbles (de Melo *et al.*, 2014).

De manera general, la extracción supercrítica a partir de matrices orgánicas es un proceso complejo que puede entenderse a través de los siguientes pasos consecutivos: *i*) el FSC entra en contacto con la matriz e induce un rompimiento de sus paredes celulares liberando y extrayendo los compuestos presentes, *ii*)

estos compuestos se difunden a través de los poros y la estructura lignocelulósica de la matriz, hasta que llegan a su superficie, y *iii*) los compuestos extraídos se solubilizan en el FSC (Brunner, 1994). En muchos casos la matriz puede ser inerte y todos los compuestos extraídos pasan a la fase fluida. No obstante, es posible que parte de estos compuestos sean solubles tanto en la matriz como en el FSC. En este último caso, los rendimientos de la extracción se verán limitados tanto por la naturaleza de la matriz como por el FSC (Reverchon, 1997). Adicionalmente puede ocurrir que muchos compuestos sean extraídos al mismo tiempo y se generen o no efectos competitivos entre sí.

Por lo tanto, la implementación de esta técnica requiere del conocimiento de modelos que describan el comportamiento de los mecanismos de transferencia de masa considerando tanto las características morfológicas de la matriz de trabajo como el tiempo de contacto entre ésta y el FSC. En este contexto, para diámetros de partículas menores se garantiza una mayor área de transferencia favoreciendo la extracción de compuestos (Mukhopadhyay, 2000).

En los últimos años, se han realizado numerosos esfuerzos teóricos y experimentales que buscan explicar estos mecanismos (Meireles, 2008; Oliveira et al., 2011). De manera general, la literatura distingue 3 tipos de modelos: *i*) los empíricos, estos buscan funciones que describan la forma hiperbólica de los perfiles de concentración con respecto al tiempo, sin embargo, no tienen significado físico que ofrezca información sobre el proceso, *ii*) los análogos a la transferencia de calor, estos asumen que el mecanismo de transferencia de masa dominante en toda la extracción se lleva a cabo por difusión, siendo una limitante para describir el mecanismo de masa por convección y *iii*) los modelos a partir de un balance diferencial de masa, estos son más flexibles debido a que dependen de las suposiciones y consideraciones que se establezcan para simplificar el modelo, pero pueden llegar a ser complejos durante su solución. En la **Tabla 1** se presentan brevemente los modelos expuestos anteriormente.

Asimismo, es importante señalar que la mayoría de estudios se han realizado en modo dinámico, en donde las velocidades de flujo a menudo generan efectos de arrastre, ocasionando posibles sobrestimaciones en los datos de concentración y alterando el adecuado entendimiento del proceso de extracción (Reverchon, 1997).

**Tabla 1** Clasificación de modelos

Categoría	Modelo	Ecuación	Parámetros
Empíricos	Langmuir	$m_E = \frac{A_1 * t}{B_{1E} + t}$	$A_1$ : representa la cantidad total de soluto que puede obtenerse en la extracción $B_{1E}$ : tiene relación con la transferencia de masa $D_{ap}$ : coeficiente de difusión aparente
Analogía con transferencia de calor	de Reverchon	$m_E = \left(1 - \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{-n^2 \pi^2 D_{ap} t}{R_p^2}\right) x_0 m_t$	R: radio de la partícula $x_0$ : rendimiento global $m_t$ : masa total de partículas en la columna de extracción. $Y$ : Concentración de soluto en la fase fluida
Balance de transferencia de masa	de Tan y Liou	$\vartheta \frac{\partial Y}{\partial z} + \frac{\partial Y}{\partial t} = -\frac{(1-\varepsilon)\rho_s}{\rho\varepsilon} \frac{\partial X}{\partial t}$ $\frac{\partial X}{\partial t} = -k_d X$	$X$ : concentración de soluto en la interfase $\varepsilon$ :porosidad $k_d$ :constante de desorción $\rho_s$ :densidad de la matriz

Adaptado de: Meireles *et al.* (2008)

En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue estudiar en modo semi-continuo el comportamiento de la concentración de tres familias de compuestos bioactivos: **i)** flavan-3-oles (representado por la (-)-epicatequina), **ii)** polifenoles simples (representado por ácido gálico) y **iii)** carotenoides (representado por  $\beta$ -caroteno) totales extraídos y la evolución de la capacidad antioxidante en función del tiempo de contacto matriz-FSC. Como matriz de trabajo se utilizó la cáscara de cacao del clon CCN-51 y como FSC se propuso usar la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol. Estos datos se correlacionaron a través de un modelo diferencial de masa adaptado para describir los perfiles de concentración de este sistema (cáscara de cacao + CO<sub>2</sub>-sc + etanol).

Este trabajo forma parte del proyecto interno VIE-5466 titulado “Ajuste matemático de la solubilidad de polifenoles en dióxido de carbono supercrítico y etanol aplicado a los residuos agroindustriales de la cadena cacao-chocolate”.

## 1. METODOLOGÍA

En la **Figura 1** se resume la secuencia metodológica seguida en la presente investigación. Para efectos ilustrativos, las siguientes secciones presentan una breve descripción de los reactivos, materiales y procedimientos implementados.



**Figura 1.** Secuencia metodológica

### 1.1. REACTIVOS

Dióxido de carbono (99,9 % p/p) de Linde Colombia S.A. (Bogotá, Colombia); etanol absoluto (99,9 % v/v), metanol (99,9 % v/v), reactivo de Folin-Ciocalteu (12 N), carbonato de sodio (99,9 % p/p), ácido gálico (99,9 % p/p, grado analítico), (-)-epicatequina (99,9 % p/p, grado analítico),  $\beta$ -caroteno (99,9 % p/p, grado analítico), vainillina (99,9 % p/p, grado analítico), ácido clorhídrico (1,2 N), Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) de Merck (Darmast, Alemania); fluoresceína disodio (FL), AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido), buffer de fosfato (75 mM, pH 7,4) de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU); hipoclorito de sodio (13 % v/v) de Suquin Ltda. (Bucaramanga, Colombia). En todos los casos, los reactivos fueron usados sin realizar purificación adicional.

### 1.2. EQUIPOS Y ACCESORIOS

Balanza analítica (Ohaus, LB-003412), estufa para secado (Binder, WTC), empacador al vacío (Oster, V2040), rotoevaporador (Buchi, R-210), liofilizador de bandejas (Virtis Advantage Plus, ES-53), espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, 4001/4),

agitador de vórtice (Heidolph Instruments, D-91126 Schwabach) y espectrofluorímetro (Fluoroskan, Ascent 2,6).

### 1.3. RECOLECCIÓN, ACONDICIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO

- Recolección: Para este estudio se recolectaron 30 frutos de cacao del clon CCN-51 en la cosecha comprendida entre octubre de 2013 y enero de 2014. Los muestreos se realizaron en tres plantaciones diferentes: La Victoria (Rionegro, altitud promedio: 708 msnm, temperatura promedio: 298,15 K), Villa Mónica (San Vicente de Chucurí, altitud promedio: 693 msnm, temperatura promedio: 300,15 K) y Lebrija (Lebrija, altitud promedio: 1086 msnm, temperatura promedio: 297,15 K). Se cuidó de seleccionar frutos con características físicas similares (longitud promedio:  $0,2213 \pm 0,0206$  m, diámetro promedio:  $0,0926 \pm 0,0082$  m) y grado de madurez fisiológico homogéneo (24 semanas). Luego de la recolección, los frutos se cubrieron con papel y se almacenaron en una nevera portable a 276,15 K.
- Acondicionamiento: Para evitar su oxidación, los frutos se acondicionaron en un tiempo no mayor a 180 min, contados a partir de la recolección. En todos los casos, éstos se lavaron utilizando una solución de hipoclorito de sodio (0,05 % v/v) y se cortaron longitudinalmente en 8 secciones. Los granos y mucílago se removieron de forma manual con espátulas de aluminio, mientras que la cáscara se cortó en trozos de  $\sim 2,00 (\pm 0,50)$  cm<sup>3</sup> y se sometió a un tratamiento térmico de dos etapas para inhibir la acción de la enzima polifenol oxidasa (PPO) (Sierra & Peñaranda, 2013). En la primera etapa de la inhibición, los trozos se colocaron en contacto con agua a 368,15 K por 5 min. Posteriormente, estos se sumergieron en agua a 274,15 K durante 20 min (Alzamora *et al.*, 2004). La inhibición de la enzima se verificó cualitativamente utilizando una solución acuosa de catecol al 1 % p/v. Para favorecer su secado, los trozos de cáscara se sometieron a un segundo proceso de corte (hasta reducir su tamaño a aproximadamente  $0,70 \pm 0,35$  cm<sup>3</sup>;

[Martínez, 2007](#)) y la humedad se removió a 323,15 K en una estufa con sistema de recirculación de aire durante 1560 min (tiempo necesario para que el material alcanzara peso constante, ver **AnexoB**). El tamaño del material se redujo utilizando un molino de cuchillas y su retenido se sometió a un segundo proceso de molienda, empleando un molino de anillos. Finalmente, el material se empacó al vacío en paquetes de 122,0 ( $\pm 0,1$ ) g y se almacenó en condiciones de oscuridad a una temperatura de 278,15 K.

- Caracterización: el material particulado (cáscara de cacao) se caracterizó físicamente como se describe a continuación: La determinación de las propiedades texturales de las partículas mediante el análisis de las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno según el procedimiento descrito por [Hernández \(2013\)](#). El anterior procedimiento se describe en detalle en el **AnexoC**.

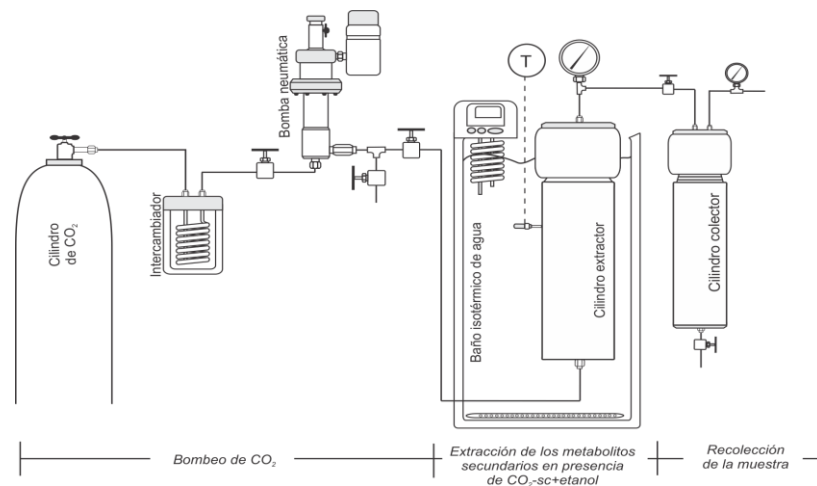
La composición química del material fue tomada de una investigación previa realizada por [Jaimes & Pico \(2014\)](#). La metodología utilizada en el trabajo anterior se describe a continuación: *i*) la cuantificación del contenido de humedad, cenizas, lípidos, fibra, proteína y carbohidratos presentes en el material de extracción utilizando los métodos 966,02; 923,03; 920,39; 920,87; 962,09 y 991,43 de la *Official Analytical Chemists Association (AOAC, 1996)*, y *ii*) la cuantificación del contenido de flavan-3-oles, polifenoles y carotenoides totales, empleando la técnica de extracción sólido-líquido en medio polar y apolar según las metodologías descritas por [Perea-Villamil et al. \(2009\)](#) y [Kao et al. \(2012\)](#), respectivamente. Estos procedimientos se describen en el **AnexoC**.

#### 1.4. EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA

Condiciones de experimentación: el contenido de flavan-3-oles (CFT), polifenoles (CPT) y carotenoides (CCT) totales se evaluó variando el tiempo de contacto matriz-FSC (cáscara de cacao+CO<sub>2</sub>-sc+etanol) entre 600 y 14400 s. Estos límites se establecieron considerando que la literatura reporta tiempos de contacto que

pueden alcanzar hasta 1800 y 12000 s ([Salgin, 2007](#); [Rodrigues et al., 2002](#)). Asimismo, con el fin de hacer un seguimiento detallado de la evolución de la concentración, se realizaron 12 muestreos. Los primeros cuatro puntos se evaluaron con intervalos de 600 s, los siguientes seis puntos con intervalos de 1200 s y los dos últimos puntos con intervalos de 2400 s. Las extracciones se realizaron a 313,15 K, 20 MPa, 20% de etanol y diámetro de partícula promedio de 0,25 mm, condiciones reportadas como favorables para la obtención de metabolitos secundarios a partir de otras matrices orgánicas según los estudios previos realizados por [Martínez et al. \(2004\)](#), [Talansier et al. \(2008\)](#), [Mantell et al. \(2003\)](#) y [Martínez et al. \(2012\)](#), respectivamente. Además, cabe resaltar que estas condiciones (presión, relación cosolvente/solvente y diámetro de partícula promedio) coinciden con las reportadas como favorables a partir de cáscara de cacao clon CCN-51 en un estudio previo realizado por [Jaimes & Pico \(2014\)](#).

- Proceso de extracción supercrítica: las extracciones se llevaron a cabo en el equipo de fluidos supercríticos diseñado y construido en el Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia (sede Manizales) presentado en la **Figura 2**. Todos los puntos se evaluaron al menos por duplicado, en experimentos individuales y siguiendo el procedimiento descrito por [Cerón \(2013\)](#).



**Figura 2.** Montaje experimental del equipo de fluidos supercríticos

En un experimento típico, 60,000 ( $\pm 0,001$ ) g de cáscara de cacao y 45,4 ( $\pm 0,1$ ) cm<sup>3</sup> de etanol se dispusieron dentro de un cilindro extractor de 250 cm<sup>3</sup>. El dióxido de carbono se bombeó utilizando una bomba neumática (Williams-Milton Roy, CP250V225) y la temperatura se acondicionó con un baño isotérmico de agua y burbujeo de aire. Una vez alcanzadas las condiciones de experimentación (P: 20 MPa y T: 313,15 K), el sistema permaneció en modo pseudo-estático durante el tiempo a evaluar (600 a 14400 s). Finalmente, el sistema se descomprimió y el extracto se almacenó dentro de un cilindro colector de 240 cm<sup>3</sup> acondicionado con 50 cm<sup>3</sup> de etanol (que hizo las veces de trampa de soluto). Los extractos se reenvasaron en viales de vidrio (de color ámbar) de 125 cm<sup>3</sup>, bajo condiciones de oscuridad y refrigerados a 276,15 K. En todos los casos, la presión y temperatura de experimentación se midieron utilizando un manómetro Bourdon (Ritherm, EN837-1), y una termocupla tipo K acoplada a un termómetro digital (Hanna, Hi 935005), respectivamente. La desviación promedio en las condiciones de presión y temperatura fue de  $\pm 0,5$  MPa y de  $\pm 0,2$  K.

#### **1.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE LOS PSEUDOCOMPONENTES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS**

- Preservación y almacenamiento de los extractos: los extractos se concentraron por evaporación al vacío a 323,15 K y 0,008 MPa (Cerón, 2013) y se dispusieron en viales de vidrio color ámbar. Seguidamente la humedad presente en los extractos se eliminó por liofilización (secado primario a 233,15 K y 0,013 MPa durante 36 horas y secado secundario en gradiente desde 263,15 K hasta 318,15 K durante 24 horas; Ortega *et al.*, 2008); una vez finalizada esta etapa, se almacenaron con atmósfera de nitrógeno, sellados a presión y refrigerados a 278,15 K hasta su posterior análisis.
- Determinación del rendimiento de la extracción: el rendimiento total de extracción se determinó por gravimetría (Meireles *et al.*, 2008), y se expresó como la relación porcentual entre los gramos de extracto liofilizado y los gramos de cáscara de cacao (en base seca), utilizando la ecuación (1).

$$\% Rend = (masa_{extracto\ liofilizado} / masa_{cáscara\ de\ cacao\ seca}) * 100 [=] g\ EL / g\ ms \quad (1)$$

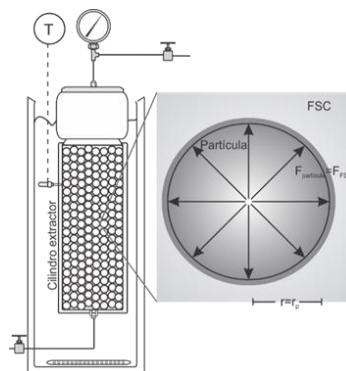
- Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT): las muestras de análisis se prepararon de acuerdo al procedimiento propuesto por [Perea-Villamil et al., \(2009\)](#). A cada 50 µL de extracto se le adicionaron 1500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 10 veces en agua destilada. Esta mezcla se agitó por 30 segundos y se almacenó bajo condiciones de oscuridad por 5 min. Posteriormente se adicionaron 1500 µL de una solución de carbonato de sodio (7,5 % p/v) y la mezcla final se incubó por 60 min bajo condiciones de oscuridad. La absorbancia de las muestras se determinó a 765 nm, usando agua destilada como blanco. El CPT se calculó a partir de una curva de calibración construida con soluciones estándar de ácido gálico (ver **AnexoD**) y se expresó en mg de equivalentes de ácido gálico por g de extracto liofilizado (mg EAG/ g EL).
- Determinación del contenido de flavan-3-oles totales (CFT): las muestras se prepararon siguiendo el procedimiento de [Nakamura et al. \(2003\)](#). En un análisis regular, 500 µL del extracto se mezclaron con 1250 µL de vainillina (1% p/v) y 1250 µL de HCl (9M en metanol). Esta mezcla se incubó durante 20 min a 303,15 K y bajo condiciones de oscuridad. Para cada caso se utilizaron dos blancos: *i*) reemplazando el volumen de muestra por vainillina (1% p/v), y *ii*) reemplazando la solución de vainillina por metanol, y la absorbancia final se determinó a 500 nm. El CFT se calculó a partir de una curva de calibración construida con soluciones estándar de (-)-epicatequina (ver **AnexoD**) y se expresó en mg de equivalentes de (-)-epicatequina por g de extracto liofilizado (mg EEP/ g EL).
- Determinación del contenido de carotenoides totales (CCT): todos los análisis se realizaron de acuerdo a [Rodríguez-Amaya et al. \(2001\)](#). La absorbancia de las muestras se determinó a 450 nm con etanol como blanco. El CCT se calculó a partir de una curva de calibración construida con soluciones estándar de β-caroteno (ver **AnexoD**).

Finalmente, el CCT se expresó en mg de equivalentes de  $\beta$ -caroteno por g de extracto liofilizado (mg EBC/ g EL).

- Determinación de la capacidad antioxidante: la capacidad antioxidante se evaluó a través del método ORAC hidrofílico, siguiendo la metodología propuesta por [Huang et al. \(2002\)](#). Todos los análisis se realizaron con FL ( $8,16 \cdot 10^{-5}$  mM) como indicador molecular y blanco de ataque; y AAPH (153 mM) como generador de radicales peroxilo. Brevemente, 150  $\mu$ L de FL y 25  $\mu$ L de la solución a valorar (extracto, estándar o blanco) se adicionaron sobre una microplaca de poliestireno de 96 pozos y se precalentaron a 310,15 K por 10 min en la cámara de un espectrofluorímetro. A continuación a cada pozo se le adicionaron 25  $\mu$ L de AAPH. El decaimiento de la señal de fluorescencia se siguió por 60 min, bajo longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 530 nm, respectivamente. La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración empleando Trolox como estándar (ver **AnexoD**) y los resultados se expresaron en  $\mu$ mol de equivalentes de Trolox por gramo de extracto liofilizado ( $\mu$ mol ET/g EL).

## 1.6. FORMULACIÓN Y DESARROLLO DEL MODELO MATEMÁTICO

- Consideraciones y Suposiciones: extendiendo las hipótesis de [Wongkittipong et al. \(2004\)](#), [Rai et al. \(2014\)](#) y [Rakotondramasy-Rabesiaka et al. \(2010\)](#), el sistema de este trabajo se modeló bajo las consideraciones y suposiciones expuestas a continuación. Para efectos ilustrativos, en la **Figura 3** se muestra la representación gráfica del sistema de extracción: cáscara de cacao +  $\text{CO}_2$ -sc + etanol.



**Figura 3.** Representación gráfica del sistema de extracción (cáscara de cacao +  $\text{CO}_2$ -sc + etanol)

**i)** Las partículas del material de extracción se consideran esferas simétricas y homogéneas, **ii)** el soluto se encuentra uniformemente distribuido en la partícula, **iii)** el sistema opera en modo semi-continuo, a temperatura y presión constante, **iv)** la densidad de la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol permanece constante durante el proceso de extracción, **v)** la resistencia a la transferencia de masa en la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol es despreciable y la concentración del soluto sólo depende del tiempo. Por lo tanto se asume que todo el soluto que ha sido transferido, se encuentra distribuido uniformemente en la fase fluida, **vi)** los perfiles de concentración de flavan-3-oles, polifenoles y carotenoides totales puede ser modelado en términos de sus pseudo-componentes: (-)-epicatequina, ácido gálico y β-caroteno, respectivamente, **vii)** la solución resultante es homogénea y altamente diluida. De esta manera todo lo que se extrae puede ser considerado como un soluto único, garantizando así la existencia de una mezcla binaria para cada pseudo-componente.

- Balance de masa: teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, la difusión unidireccional del soluto a través de la partícula se describe simplificando la ecuación de continuidad hasta obtener la segunda Ley de Fick, resumida en la ecuación **(2)**

$$\left(\frac{\partial C_{sto}}{\partial t}\right) = \frac{D_e}{r^2} \left( \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial C_{sto}(t,r)}{\partial r} \right) \right) \quad (2)$$

donde:  $C_{sto}$  es la concentración de soluto en la partícula,  $D_e$  es el coeficiente de difusión efectiva del soluto en la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol y  $r$  es el radio de la partícula.

Como las partículas son consideradas esferas simétricas y homogéneas, y en muchos casos sólidos porosos, el soluto está presente tanto en la fase sólida como en el fluido. Por lo tanto, la expresión analítica del flux difusivo para la mezcla binaria, se representa a través de la ecuación **(3)**. En la cual, para cualquier instante de tiempo, el flux puede ser definido en términos de la velocidad de difusión hacia la superficie de la partícula (Bird *et al.*, 2007).

$$F_{Particula} = DeA \left( \frac{\partial C_{sto}(t,r)}{\partial r} \right) \quad (3)$$

Donde,  $F_{Particula}$  es el flux desde la partícula, y  $A$  corresponde al área superficial.

Asumiendo que inicialmente ( $t = 0, \forall r$ ), **i**) la concentración en la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol es igual a cero ( $C_{sln} = 0$ ), **ii**) la cantidad inicial de soluto ( $C_o$ ) en la partícula es constante  $C_{sto}$ , y que además, **iii**) el sistema está regido por las condiciones límite/de frontera resumidas en las ecuaciones **(4)** y **(5)**, el flux generado puede ser representado por la ecuación **(6)**.

$$\text{Para } (r = 0, \forall t) \quad \left. \frac{\partial C_{sto}(t, r)}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad (4)$$

$$\text{Para } (r = r_p, t > 0) \quad \left. D_e A \left( \frac{\partial C_{sto}(t, r)}{\partial r} \right) \right|_{r=r_p} = V_{sln} \left( \frac{\partial C_{sln}}{\partial t} \right) \quad (5)$$

donde,  $V_{sln}$  es el volumen de la solución y  $r_p$  es el radio de la partícula a través del tiempo.

$$F_{FSC} = AK_T(C_{sol} - C_{sln}) \quad (6)$$

donde,  $F_{FSC}$  es el flux en la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol,  $K_T$  es el coeficiente de transferencia de masa del soluto hacia la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol SC,  $C_{sol}$  es la solubilidad del soluto en la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol y  $C_{sln}$  es la concentración de soluto acumulada en el la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol a través del tiempo.

Además, si se considera que  $F_{particula}$  es equivalente  $F_{FSC}$ , y que no existe acumulación o agotamiento del soluto en la interface, las ecuaciones **(3)**, **(5)** y **(6)** dan origen a la ecuación **(7)**.

$$V_{sln} \left( \frac{\partial C_{sln}}{\partial t} \right) = AK_T(C_{sol} - C_{sln}) \quad (7)$$

Finalmente, con base en las condiciones iniciales y de frontera, y usando la aproximación lineal propuesta por [Rakotondramasy-Rabesiaka et al. \(2010\)](#), la ecuación **(8)** se presenta como la solución analítica de la ecuación **(7)**.

$$\ln \left( \frac{C_{sol}}{C_{sol} - C_{sln}} \right) = \left( \frac{K_T A}{V_{sln}} \right) t \quad (8)$$

El modelo se resolvió a través de un script programado en Matlab® R2009b, desarrollado por MathWorks®. En el **AnexoE** se resume el algoritmo de cálculo implementado.

- Evaluación del grado de ajuste: este procedimiento se realizó calculando de la desviación absoluta relativa promedio (AARD) expuesta en la ecuación **(9)**.

$$AARD(\%) = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{(C_{sol})_{exp,i} - (C_{sol})_{cal,i}}{(C_{sol})_{exp,i}} \right| \quad (9)$$

donde  $n$  es el número de puntos a evaluar,  $C_{sol}$  es la concentración de soluto, experimental (*exp*) y calculada (*cal*) para cada punto.

## 1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los puntos evaluados se implementó el uso del análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor y la prueba de Tukey de rango estudentizado (HSD,  $\alpha=0,05$ ). Estos análisis se realizaron utilizando el software Minitab 16® en versión de prueba para Windows.

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Tabla 2** se presenta la composición química de la cáscara de cacao clon CCN-51 reportadas por [Jaimes & Pico, 2014](#). Estos valores reportados son similares a los obtenidos por trabajos previos para cáscara de cacao de clones Brasileños ([Vriesmann et al., 2011](#))

**Tabla 2.** Composición de la cáscara de cacao (clon CCN-51).

<b>Componente</b>	<b>Contenido * (g/100 g ms)</b>
Humedad	4,56 ± 0,30
Lípidos	0,25 ± 0,01
Proteína	5,99 ± 0,05
Ceniza	7,76 ± 0,01
Fibra	28,13 ± 0,10
Carbohidratos	81,44 ± 0,28
Valor calórico (kcal/ 100 g)	351,97

<b>Componente</b>	<b>Contenido * (mg/ g ms)</b>
Polifenoles totales (mg EAG/ g ms)	32,738 ± 1,332
Flavan-3-oles totales (mg EEP/ g ms)	21,377 ± 0,598
Carotenoides totales (mg EBC/ g ms)	0,077 ± 0,009

Adaptado de: [Jaimes & Pico \(2014\)](#)

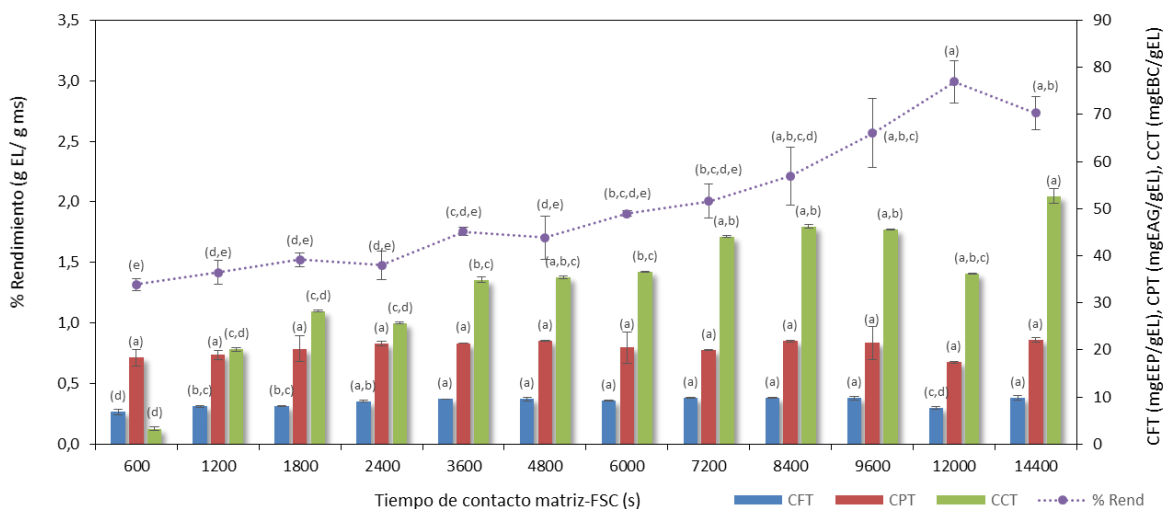
En comparación con estudios similares, el contenido de humedad final (4,56 %) de la cáscara de cacao usada en este trabajo, se encuentra dentro del intervalo definido como favorable para la extracción de compuestos bioactivos a partir de otros materiales. En este contexto, [Nobre et al., \(2009\)](#) reportaron que humedades cercanas al 4,6 % les permitieron alcanzar mayores rendimientos en la extracción supercrítica de licopenos a partir de cáscara de tomate. Asimismo, [Nagy & Simandi \(2008\)](#) encontraron que sólo las humedades superiores al 18 % son capaces de generar efectos negativos sobre los rendimientos de extracción al trabajar en medio supercrítico.

Con relación al contenido de fibra, es importante señalar que la eventual presencia de celulosa, hemicelulosa y/o lignina, podría actuar como barrera durante el proceso de extracción, afectando los rendimientos ([Rodrigues et al., 2002](#)). Nótese además, que el contenido de lípidos, proteína y carbohidratos de la cáscara de

cacao es considerablemente representativo. Lo anterior indica que durante el proceso de extracción podría promoverse una obtención simultánea de algunos de estos metabolitos secundarios (Reverchon, 1996).

Por otro lado, es importante resaltar que los valores obtenidos en la extracción sólido-líquido se establecen en este trabajo como el contenido máximo de flava-3-oles, polifenoles y carotenoides que pueden ser extraídos a partir de la cáscara de cacao CCN-51. Con base en lo anterior, se encuentra que el contenido de polifenoles totales (CPT) determinado es 1,64 veces mayor y 1,22 veces menor que los valores reportados por Martínez *et al.* (2012) y Vriesmann *et al.* (2011), respectivamente, en cáscaras de clones ecuatorianos y brasileros. Si bien, es importante señalar que el CPT de la cáscara de esta variedad de cacao (clon CCN-51) mostró ser 1,79 y 2,14 veces menor que el de la cáscara de guayaba y mango. No obstante, este valor es 2,59 y 1,34 veces mayor que el reportado para la cáscara de aguacate y granadilla, respectivamente (Ayala-Zavala *et al.*, 2011).

## 2.1. CONTENIDO DE FLAVAN-3-OLES, POLIFENOLES Y CAROTENOIDES TOTALES EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO MATRIZ-FSC



**Figura 4.** Variación del rendimiento y contenido de flavan-3-oles (CFT), polifenoles (CPT) y carotenoides (CCT) totales en función del tiempo de contacto matriz-FSC

La **Figura 4** resume la variación del rendimiento y contenido de flavan-3-oles (CFT), polifenoles (CPT) y carotenoides (CCT) totales en función del tiempo de contacto entre la cáscara de cacao y la mezcla de solventes CO<sub>2</sub>-sc + etanol (matriz-FSC). Los valores reportados corresponden al promedio de al menos 2 mediciones y las barras de error indican la variación alcanzada en cada caso. Según la prueba de Tukey HSD, los puntos con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sus valores medios (ver Anexo).

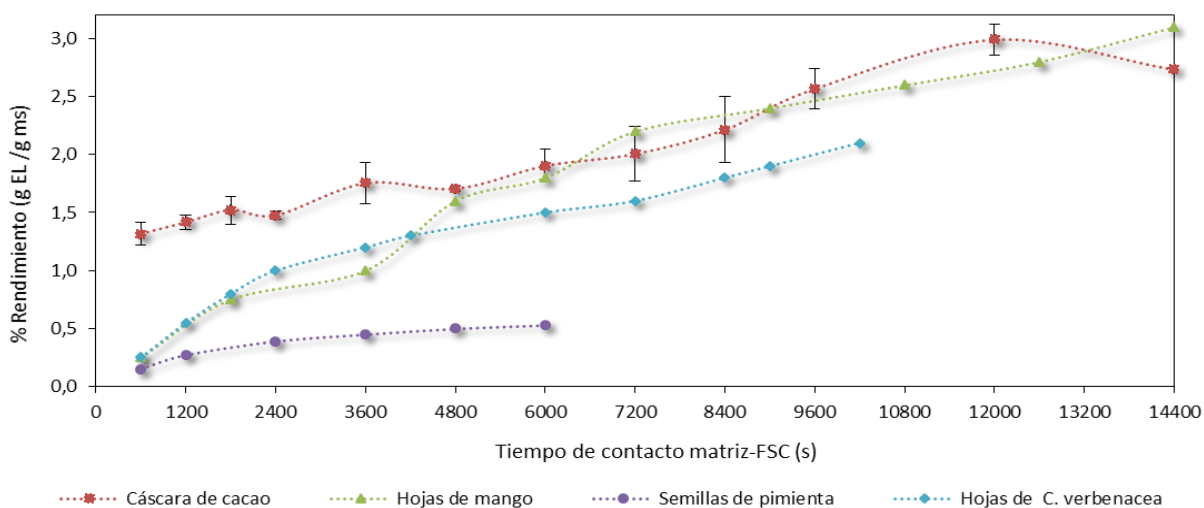
De manera general, el CFT presentó un aumento continuo durante los primeros 2400 s, y luego de este tiempo, no se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores de concentración. Lo anterior evidencia que la transferencia de flavan-3-oles hacia la fase fluida tiende a ser constante entre los 3600 y 14400 s (%RSD=7,8). Sobre este intervalo se obtuvo un CFT promedio de 9,40 ( $\pm 0,73$ ) mg EEP/ g EL.

Por otro lado, el CPT extraído se mantuvo constante (%RSD=7,6) durante todo el período de experimentación, alcanzando un valor promedio de 20,45 ( $\pm 1,55$ ) mg EAG/ g EL. Estos resultados sugieren que un 45,97 % de los polifenoles totales extraídos son flavan-3-oles. En comparación con estudios similares, el CPT extraído en este trabajo es sólo 1,30 y 1,76 veces menor que el alcanzado por [Farías-Campomanes et al. \(2013\)](#) a partir de cáscara de uva ( $23,0 \pm 0,2$  mg EAG/ g EL) y [Andrade et al. \(2012\)](#) a partir de cascarilla de café ( $36 \pm 1$  mg EAG/ g EL), respectivamente.

Con relación al CCT, la representación gráfica muestra la existencia de aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) hasta los 6000 s, después de este período el CCT se hizo constante (%RSD=13,1) tomando un valor promedio de 44,95 ( $\pm 5,89$ ) mg EBC/ g EL. Este valor es 8,03 y 8,99 veces mayor que el extraído por [García et al. \(2013\)](#) y [Espinosa-Pardo et al. \(2014\)](#) a partir de cáscara de mango ( $5,6 \pm 0,5$  mg EBC/ g EL) y pulpa de chontaduro ( $\sim 5$  mg EBC/ g EL), respectivamente. En este contexto es

importante señalar que los estudios anteriores no utilizaron cosolvente. Por lo tanto, los resultados de este trabajo sugieren que la presencia de etanol en la fase fluida logra favorecer la coextracción de compuestos con polaridad disímil (*i.e.*, tanto polifenoles como carotenoides) a partir de cáscara de cacao. Esta observación ya había sido reportada en estudios similares presentados por [Reverchon \(1997\)](#) para otras matrices orgánicas.

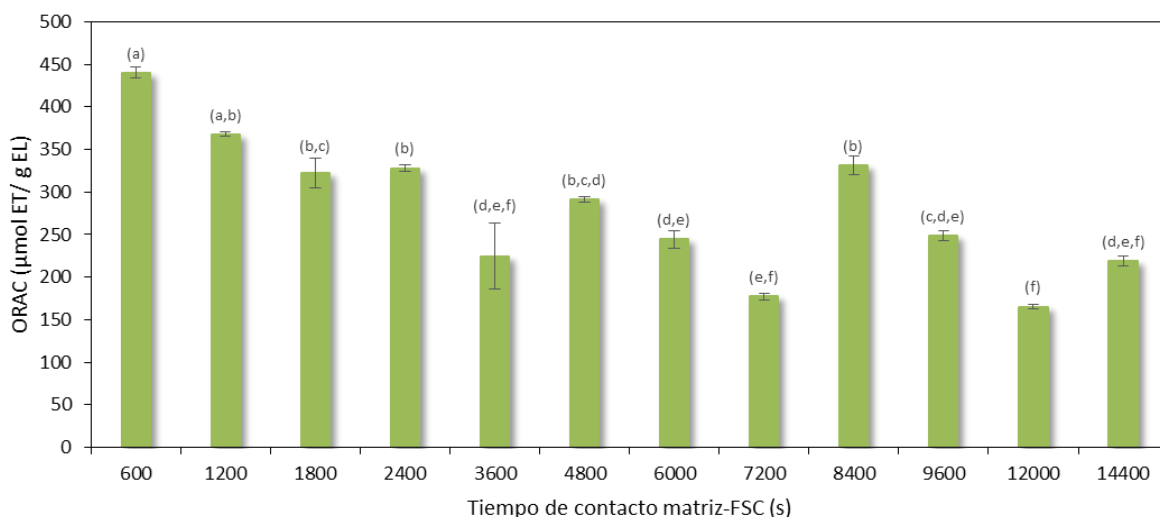
Finalmente, el rendimiento del proceso de extracción exhibió una tendencia constante durante los primeros 4800 s de contacto entre la matriz y el CO<sub>2</sub>-sc + etanol. Luego de este tiempo se observó un aumento del 37,73 %, alcanzándose un rendimiento promedio final de 2,30 (±0,47) g EL/ g ms a los 14400 s. La tendencia de crecimiento observada en este trabajo es congruente con la reportada en algunos estudios previos que no emplearon cosolvente. No obstante, como puede constatarse en la **Figura 5**, el rendimiento de extracción a partir de cáscara de cacao implementando el uso de etanol como cosolvente logra ser 1,06, 1,55 y hasta 5,18 veces superior al obtenido con CO<sub>2</sub>-sc puro a partir de hojas de mango (a 323,15 K, 30 MPa; [Prado et al., 2013](#)), hojas de *Cordia Verbenacea* (a 313,15 K, 20 MPa; [Quispe-Condori et al., 2008](#)) y pimienta (a 333,15 K, 15MPa; [de Aguiar et al., 2014](#)), respectivamente.



**Figura 5.** Comparación del rendimiento de extracción obtenido a partir de diferentes matrices

## 2.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE CONTACTO

En la **Figura 6** se presenta el comportamiento de la capacidad antioxidante de los extractos en función del tiempo de contacto entre la cáscara de cacao y la mezcla de solventes CO<sub>2</sub>-sc + etanol (matriz-FSC). El valor ORAC reportado corresponde al promedio de al menos 2 mediciones y las barras de error indican la variación estimada en cada caso. De acuerdo con la prueba de Tukey HSD, todos los puntos evaluados poseen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre sus valores medios.



**Figura 6.** Comportamiento de la capacidad antioxidante (valor ORAC) de los extractos en función del tiempo de contacto matriz-FSC.

Los valores ORAC determinados en este trabajo no lograron mostrar una tendencia definida en función del tiempo de contacto matriz-FSC, sin embargo, para este caso en particular fue posible identificar que la capacidad antioxidante de los extractos disminuye a una razón de 0,96 μmol ET•s/ g EL entre los 600 y 14400 s. Asimismo al comparar este comportamiento con los perfiles presentados en la **Figura 4**, es posible notar que mientras el CFT, CPT, CCT y rendimientos crecen en función del tiempo de contacto matriz-FSC, la capacidad antioxidante de los extractos se reduce. Lo anterior puede explicarse si se considera que ante períodos de contacto largos entre la matriz y el FSC, una mayor cantidad de compuestos se solubiliza, consiguiendo dar lugar a interacciones antagónicas y sinérgicas, las

cuales son reflejadas en la capacidad antioxidante (Antolovich *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005) de cada uno de los extractos. En este trabajo, lo anterior puede estar relacionado con el incremento significativo de la concentración de carotenoides totales a través del tiempo, sugiriendo que estos tiene un efecto antagónico en la capacidad antioxidante.

No se encontraron precedentes en la literatura de trabajos que evalúen la evolución de los valores ORAC en función del tiempo de contacto matriz-FSC para fines de comparación.

Con relación a otros estudios efectuados en medio supercrítico, el valor ORAC promedio de todos los extractos de cáscara de cacao ( $279,98 \pm 81,42 \mu\text{mol ET/g EL}$ ) fue 1,64 veces menor en comparación con extracto de flores Sabdariffa; asimismo, fue 2,04, 2,08 y 53,74 veces mayor a la capacidad antioxidante determinada para extractos (con y sin la presencia de etanol como cosolvente) de hojas, flores y semillas de *Thymus lotocephalus*, *Lavandula viridis* y *Amaranthus* spp como puede constatarse en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Comparación de la capacidad antioxidante (valores ORAC) para extractos obtenidos en medio supercrítico

Fuente	ORAC ( $\mu\text{mol ET/g EL}$ )*	Condiciones de operación			Referencia
		P (MPa)	T (K)	% X (kg/kg)	
<i>Theobroma cacao</i> L. (extracto de cáscara)	$279,98 \pm 81,42$	20	313,15	20	Este trabajo
<i>H. Sabdariffa</i> (extracto de flores)	$460 \pm 16$	18	323,00	11	Mejía, 2014
<i>Thymus lotocephalus</i> (extracto de hojas y flores)	$116,36 \pm 4,55$	18	313,15	0	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>Lavandula viridis</i> (extracto de hojas)	$134,06 \pm 13,69$	18	313,15	0	Costa <i>et al.</i> , 2012
<i>Amaranthus</i> spp. (extracto de semillas)	$5,21 \pm \text{N.D.}$	25	313,15	2	Kraujalis <i>et al.</i> , 2013

\*N.D.: No disponible

Finalmente, es importante resaltar que el valor ORAC alcanzado a los 600 s ( $439,98 \pm 6,50 \mu\text{mol ET/ g EL}$ ) de contacto, está 3,21 veces por debajo del reportado para el grano de cacao en verde del mismo clon (CCN-51,  $1414,23 \pm 236,15 \mu\text{mol ET/ g ms}$ , [Sierra & Peñaranda, 2013](#)). Asimismo, este valor es sólo 1,54 y 1,21 veces menor que el reportado por [Arias \(2012\)](#) para antioxidantes comerciales sintéticos como el BHT ( $678 \pm 10 \mu\text{mol ET/ g ms}$ ) y la vitamina E ( $536 \pm 8 \mu\text{mol ET/ g ms}$ ), respectivamente. Estos resultados sugieren que la cáscara de cacao (clon CCN-51) podría ser eventualmente utilizada para la extracción de compuestos con valor antioxidante, usando como solventes  $\text{CO}_2\text{-sc}$  + etanol.

### 2.3. AJUSTE DEL MODELO MATEMÁTICO PARA DESCRIBIR LA EXTRACCIÓN SUPERCRTICA DE CÁSCARA DE CACAO

La

**Tabla 4** resume los parámetros característicos utilizados para modelar el sistema de extracción: cáscara de cacao +  $\text{CO}_2\text{-sc}$  + etanol. De manera general, las propiedades morfológicas y texturales de la cáscara de cacao guardaron similitud con las reportadas por [Kitzberger et al. \(2009\)](#) y [Talansier et al. \(2008\)](#) para otras matrices orgánicas.

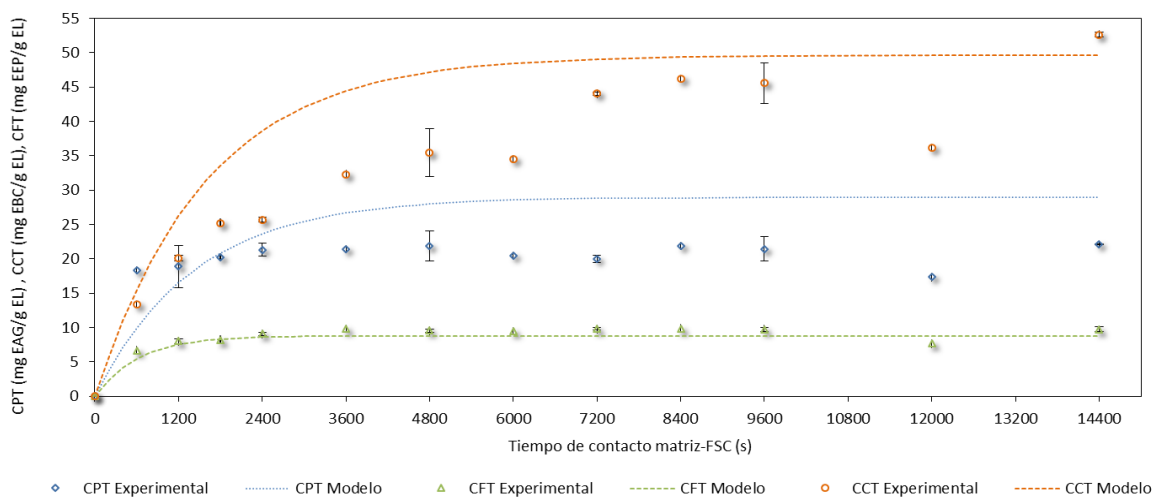
**Tabla 4.** Parámetros característicos del sistema de extracción

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Diámetro de partícula (m), $d_p$	0,26	Volumen de la solución ( $\text{m}^3$ ), $V_s$	0,00025
Radio de partícula (m), $r_p$	$2,613 \cdot 10^{-4}$	Masa de extracción en base húmeda (kg), $m_{ext,bh}$	0,060
Porosidad (m/m), $\varepsilon$	0,0127	Masa de extracción en base seca (kg), $m_{ext,bs}$	0,057
Densidad aparente ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ), $\rho_a$	1290,0	Humedad (%)	4,56
Densidad real ( $\text{kg}/\text{m}^3$ ), $\rho_r$	1309,1	Temperatura (K), $T$	313,15
Área superficial ( $\text{m}^2$ ), $A$	315,02	Presión (MPa), $P$	20
Volumen de poro ( $\text{m}^3/\text{g}$ ), $V_p$	$9,912 \cdot 10^{-3}$	Concentración de etanol (kg/kg), $X$	20 %
		<i>Polifenoles</i>	<i>Flavan-3-oles</i>
Masa de soluto en el material de extracción (kg E/ kg ms)		$1,9 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$
Concentración de soluto inicial ( $\text{kg E}/\text{m}^3$ ), $C_o$		42,86	27,98
			<i>Carotenoides</i>
			$4,4 \cdot 10^{-6}$
			0,10

En la **Tabla 5** se presentan los coeficientes de transferencia de masa ( $K_T$ ) estimados en este trabajo para describir la extracción de flavan-3-oles, polifenoles y carotenoides totales a partir de cáscara de cacao. Estos coeficientes representan la velocidad a la que se transfirió cada uno de los componentes estudiados hacia la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol (Treybal, 1968). Una comparación general de sus valores evidencia que la velocidad de transferencia de los flavan-3-oles es mayor que para los polifenoles y carotenoides (*i.e.*,  $K_{T_{CFT}} > K_{T_{CPT}} > K_{T_{CCT}}$ ), indicando que estos últimos requerirán de un mayor tiempo de contacto para ser transferidos hacia la mezcla CO<sub>2</sub>-sc + etanol. Como puede observarse, los  $K_T$  estimados en este trabajo son hasta 5 órdenes de magnitud menores a los reportados en estudios previos. Estas diferencias pueden atribuirse tanto a la naturaleza y composición de las matrices de extracción como a las condiciones de experimentación evaluadas (Brunner, 1994). Asimismo, es importante señalar, que el modelo propuesto presentó una AARD promedio de 21,1, 30,8 y 47,1 % para flavan-3-oles, polifenoles y carotenoides totales en función del tiempo. Para fines de comparación, en la **Figura 7** se muestran los perfiles de concentración estimados.

**Tabla 5.** Coeficientes de transferencia de masa estimados para diferentes sistemas

Compuestos	Matriz	Condiciones de operación			Parámetros del modelo		Referencia
		T (K)	P (MPa)	X (kg/kg)	$K_T$ (m/s)	AARD (%)	
Flavan-3-oles	Cáscara de cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L)	313,15	20	20 %	$1,29 \cdot 10^{-9}$	21,1	Este trabajo
Polifenoles		313,15	20	20 %	$5,58 \cdot 10^{-10}$	30,8	Este trabajo
Carotenoides		313,15	20	20 %	$4,97 \cdot 10^{-10}$	47,1	Este trabajo
Flavanoides	Flores de Marcela ( <i>Achyrocline satureioides</i> )	318,15	20	16,4 %	$4,06 \cdot 10^{-5}$	13,2	Hatami <i>et al.</i> , 2012
Flavanoides	Flor de Manzanilla ( <i>Chamaemelum nobile</i> )	313,15	25	10 %	$1,36 \cdot 10^{-7}$	24,5	Kotnik <i>et al.</i> , 2007
Isoflavones	Haba de Soya ( <i>Glycine max</i> )	313,15	50	7,8 %	$7,85 \cdot 10^{-7}$	6,5	Kuhom <i>et al.</i> , 2012
Terpenoides	Hierba de Baizhu ( <i>Atractylodes Macrocephala</i> )	313,15	15	0 %	$6,14 \cdot 10^{-8}$	2,4	Huang <i>et al.</i> , 2011
Tocoferoles	Plumule Lotus ( <i>Plumula Nelumbinis</i> )	328,15	45	0 %	$3,81 \cdot 10^{-6}$	10,1	Jia <i>et al.</i> , 2009



**Figura 7.** Perfiles experimentales y descritos por el modelo para el contenido de flavan-3-oles (CFT), polifenoles (CPT) y carotenoides (CCT) totales en función del tiempo de contacto matriz-FSC.

## CONCLUSIONES

Los perfiles de extracción supercrítica de polifenoles obtenidos a partir de cáscara de cacao (clon CCN-51) exhibieron una tendencia constante durante todo el intervalo de experimentación, alcanzando un valor promedio de 20,45 mg EAG/ g EL. Mientras que la concentración de flavan-3-oles y carotenoides se estabilizó luego de los 2400 y 6000 s, con valores promedio de 9,4 mg EEP/ g EL y 44,95 mg EBC/ g EL, respectivamente.

Los perfiles de extracción supercrítica de flavan-3-oles, polifenoles y carotenoides totales se describieron utilizando un modelo diferencial de transferencia de masa. Este modelo presentó una desviación absoluta relativa promedio ( $AARD(\%)$ ) de 30,8 % para los polifenoles, 21,1 % para los flavan-3-oles totales y 47,1 % para los carotenoides.

Se evaluó la capacidad antioxidante de cada uno de los extractos. Estos resultados sugieren que la capacidad antioxidante se ve afectada por el tiempo de contacto matriz-FSC. El valor ORAC promedio fue 2,04, 2,08 y 53,7 veces mayor a los alcanzados a partir de extracto de hojas y flores de *Thymus lotocephalus* y *Lavandula viridis* y *amaranthus spp*, respectivamente. Lo anterior deja en evidencia que este residuo agroindustrial puede considerarse una fuente potencial de antioxidantes naturales.

El coeficiente de transferencia de masa ( $K_T$ ) estimado para los flavan-3-oles totales fue un orden de magnitud mayor que el obtenido para polifenoles y carotenoides totales. Este resultado sugiere que los flavan-3-oles son transferidos a la fase fluida en un tiempo mayor que el requerido por los polifenoles y carotenoides.

## RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Estudiar el efecto que tiene el pretratamiento del material en el comportamiento de los perfiles de extracción de los flavan-3-oles, polifenoles y carotenoides totales en función del tiempo de contacto matriz-FSC.

Revisar el planteamiento del modelo, con el fin de alcanzar una desviación absoluta relativa promedio ( $AARD(\%)$ ) permisible para establecer que el modelo es capaz de describir el comportamiento de los datos experimentales de los compuestos estudiados.

Estudiar la influencia que tienen las partículas de cáscara de cacao en el proceso de extracción supercrítica y en los perfiles descritos por el modelo.

Estudiar las interacciones sinérgicas y antagónicas que se llevan a cabo entre los diferentes compuestos extraídos y su influencia en la capacidad antioxidante, en función del tiempo de contacto matriz-FSC.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALZAMORA, Stella Maris, et al. Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas: Manual de capacitación. 2004.
- ARIAS, Agurto; STHEPANIE, Eugenia. Análisis de compuestos antioxidantes presentes en haba (*Vicia faba* L.) para su consumo hortícola. 2012.
- ANDRADE, Kátia S., et al. Supercritical fluid extraction from spent coffee grounds and coffee husks: Antioxidant activity and effect of operational variables on extract composition. *Talanta*, 2012, vol. 88, p. 544-552.
- ANTOLOVICH, Michael, et al. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 2002, vol. 127, no 1, p. 183-198.
- AYALA-ZAVALA, J. F., et al. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*, 2011, vol. 44, no 7, p. 1866-1874.
- BALASUNDRAM, Nagendran; SUNDRAM, Kalyana; SAMMAN, Samir. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 2006, vol. 99, no 1, p. 191-203.
- BARAZARTE, Humberto; SANGRONIS, Elba; UNAI, Emaldi. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, 2008, vol. 58, no 1, p. 64-70.
- BIRD, R. Byron; STEWART, Warren E.; LIGHTFOOT, Edwin N. *Transport phenomena*. John Wiley & Sons, 2007.
- BONVEHÍ, J. Serra; BENERÍA, M. Aragay. Composition of dietary fibre in cocoa husk. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A*, 1998, vol. 207, no 2, p. 105-109.
- CADENAS, Enrique, et al. *Handbook of antioxidants*. Marcel Dekker Inc., 1996.
- CERÓN SALAZAR, Ivonne Ximena, et al. *Design and Evaluation of Processes to Obtain Antioxidant-Rich Extracts from tropical fruits cultivated in Amazon*,

*Caldas and Northern Tolima Regions*. 2013. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales.

*COSMÉTICOS, UN SECTOR DE CLASE MUNDIAL* [ en línea]. Bogotá: La República, 2013-[Fecha de consulta: julio 2014]. Disponible en: <[http://www.larepublica.co/comercio-externo/cosm%C3%A9ticos-un-sector-de-clase-mundial\\_29619](http://www.larepublica.co/comercio-externo/cosm%C3%A9ticos-un-sector-de-clase-mundial_29619)>

COSTA, Patrícia, et al. Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from *Lavandula viridis* L'Hér. *Food Chemistry*, 2012, vol. 135, no 1, p. 112-121.

COSTA, Patrícia, et al. Chemical profiling and biological screening of *Thymus lotocephalus* extracts obtained by supercritical fluid extraction and hydrodistillation. *Industrial Crops and Products*, 2012, vol. 36, no 1, p. 246-256.

DE AGUIAR, Ana C., et al. Supercritical carbon dioxide extraction of *Capsicum* peppers: Global yield and capsaicinoid content. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013, vol. 81, p. 210-216.

DE MELO, M. M. R.; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2014.

DÍAZ-REINOSO, Beatriz, et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, vol. 54, no 7, p. 2441-2469.

DINÇ, Erdal; ÖZDEMİR, Abdil; BALEANU, Dumitru. An application of derivative and continuous wavelet transforms to the overlapping ratio spectra for the quantitative multiresolution of a ternary mixture of paracetamol, acetylsalicylic acid and caffeine in tablets. *Talanta*, 2005, vol. 65, no 1, p. 36-47.

- ESPINOSA-PARDO, Faber A.; MARTINEZ, Julian; MARTINEZ-CORREA, Hugo A. Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (*Bactris gasipaes*) using supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2014.
- FARIAS-CAMPOMANES, Angela M.; ROSTAGNO, Mauricio A.; MEIRELES, M. Angela A. Production of polyphenol extracts from grape bagasse using supercritical fluids: Yield, extract composition and economic evaluation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013, vol. 77, p. 70-78.
- HATAMI, Tahmasb, et al. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds from Macela (*Achyrocline satureioides*) flowers: Kinetic, experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2012, vol. 65, p. 71-77.
- HERNÁNDEZ, Liney. *Desempeño de catalizadores NiMo y CoMo soportados en alúmina modificada con K en la hidroxigenación de bioaceites*. (2013). Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander.
- HERRERO, Miguel, et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no 16, p. 2495-2511.
- HUANG, Dejian, et al. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, vol. 50, no 16, p. 4437-4444.
- HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, vol. 53, no 6, p. 1841-1856.
- HUANG, Zhen, et al. Supercritical carbon dioxide extraction of Baizhu: Experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2011, vol. 58, no 1, p. 31-39.
- JAIMES, Y.; ARANZAZU, F. Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao* L.) en Colombia, con énfasis en monilia (*Moniliophthora roreri*). *Corpoica, EE La Suiza. Produmedios, Bogotá*, 2010.

- JAIMES, Jaime; PICO, Sergio. *Estudio preliminar de la influencia de los principales parámetros de extracción usando dióxido de carbono supercrítico y etanol. Caso de estudio: obtención de polifenoles y carotenoides a partir de cáscara de cacao (clon ccn-51)*. (2014). Tesis de pregrado. Universidad Industrial de Santander).
- JIA, Dongdong; LI, Shufen; XIAO, Luan. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *Plumula nelumbinis* oil: Experiments and modeling. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2009, vol. 50, no 3, p. 229-234.
- KING, Jerry W. Modern Supercritical Fluid Technology for Food Applications. *Annual review of food science and technology*, 2014, vol. 5, p. 215-238.
- KRAUJALIS, Paulius; VENSKUTONIS, Petras Rimantas. Supercritical carbon dioxide extraction of squalene and tocopherols from amaranth and assessment of extracts antioxidant activity. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2013, vol. 80, p. 78-85.
- LANG, Qingyong; WAI, Chien M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies—a practical review. *Talanta*, 2001, vol. 53, no 4, p. 771-782.
- LIM, Tong Kwee. *Edible medicinal and non-medicinal plants*. Springer, 2012.
- LÓPEZ, L. F., et al. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y afines con énfasis en ingredientes naturales para la industria cosmética en Colombia. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Social, Bogotá*, 2009.
- MANTELL, Casimiro; RODRÍGUEZ, Miguel; MARTINEZ DE LA OSSA, Enrique. A Screening Analysis of the High-Pressure Extraction of Anthocyanins from Red Grape Pomace with Carbon Dioxide and Cosolvent. *Engineering in life sciences*, 2003, vol. 3, no 1, p. 38-42.
- MARTINEZ, Julian, et al. Valorization of Brazilian vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash ex Small) oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, vol. 52, no 21, p. 6578-6584.

- MARTINEZ, Jose L. (ed.). *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*. CRC Press, 2007.
- MARTÍNEZ, R., et al. Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 2012, vol. 49, no 1, p. 39-45.
- MEIRELES, M. Angela A. (ed.). *Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications*. CRC press, 2008.
- PUERTAS MEJÍA, Miguel A.; TOBÓN GALLEGO, Julián; ARANGO, Víctor. Kalanchoe daigremontiana Raym.-Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2014, vol. 19, no 1, p. 61-68.
- MINISTERIO DE COMERCIO, INDUSTRIA Y TURISMO. *Doce sectores de clase mundial ya tienen estrategias de responsabilidad social y empresarial*. [en línea]. Bogotá, 2012 [fecha de consulta: julio 2014]. Disponible en: < <http://www.mincit.gov.co/publicaciones.php?id=5248>>
- MONSALVE, L.; GARCÍA, C.; SIGARROA, A. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el departamento Norte de Santander, Colombia. *Revista Respuestas*, 2005, vol. 1, p. 21-28.
- MOURE, Andrés, et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 2001, vol. 72, no 2, p. 145-171.
- MUKHOPADHYAY, Mamata. *Natural extracts using supercritical carbon dioxide*. CRC press, 2010.
- NAGY, Bence; SIMÁNDI, Béla. Effects of particle size distribution, moisture content, and initial oil content on the supercritical fluid extraction of paprika. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2008, vol. 46, no 3, p. 293-298.
- NAKAMURA, Yumiko; TSUJI, Sumiko; TONOGAI, Yasuhide. Analysis of Proanthocyanidins in Grape Seed Extracts, Health Foods and Grape Seed Oils. *Journal of health science*, 2003, vol. 49, no 1, p. 45-54.

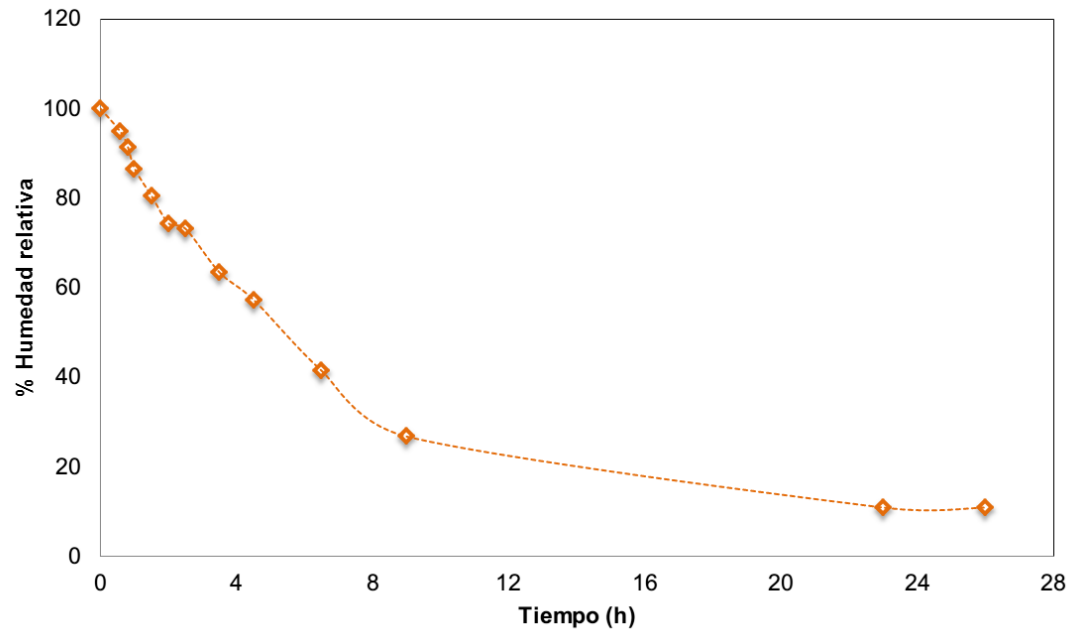
- NOBRE, Beatriz P., et al. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of *trans*-lycopene from Portuguese tomato industrial waste. *Food chemistry*, 2009, vol. 116, no 3, p. 680-685.
- OLSON, James A. Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 1999, vol. 49, no 3 Suppl 1, p. 7S-11S.
- ORTEGA, Nàdia, et al. Obtention and characterization of phenolic extracts from different cocoa sources. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2008, vol. 56, no 20, p. 9621-9627.
- PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; CADENA-CALA, Tatiana; HERRERA-ARDILA, Jenny. El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *REVISTA SALUD UIS*, 2009, vol. 41, no 2.
- PEREA-VILLAMIL, Janeth Aidé; MARTINEZ GUERRERO, Nubia; ARANZAZU HERNANDEZ, Fabio; CADENA-CALA, Tatiana. Características de calidad del cacao de Colombia. Catálogo de 26 cultivares. Fedecacao uis, 2013, edición 1.
- PRADO, Ivor M., et al. Supercritical CO<sub>2</sub> and low-pressure solvent extraction of mango (*Mangifera indica*) leaves: Global yield, extraction kinetics, chemical composition and cost of manufacturing. *Food and Bioproducts Processing*, 2013, vol. 91, no 4, p. 656-664.
- QUISPE-CONDORI, Sócrates, et al. Obtaining  $\beta$ -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2008, vol. 46, no 1, p. 27-32.
- RAI, Amit, et al. Evaluation of models for supercritical fluid extraction. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 2014, vol. 72, p. 274-287.
- RAKOTONDRAMASY-RABESIAKA, Lovasoa, et al. Estimation of effective diffusion and transfer rate during the protopine extraction process from *Fumaria officinalis* L. *Separation and Purification Technology*, 2010, vol. 76, no 2, p. 126-131.
- REVERCHON, E. Mathematical modeling of supercritical extraction of sage oil. *AIChE Journal*, 1996, vol. 42, no 6, p. 1765-1771.

- REVERCHON, Ernesto. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *The Journal of Supercritical Fluids*, 1997, vol. 10, no 1, p. 1-37.
- RODRIGUES, Vera M., et al. Determination of the solubility of extracts from vegetable raw material in pressurized CO<sub>2</sub>: a pseudo-ternary mixture formed by cellulosic structure+ solute+ solvent. *The Journal of supercritical fluids*, 2002, vol. 22, no 1, p. 21-36.
- RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington, DC: ILSI press, 2001.
- ROMERO, Milton; CABRERA, Edersson; ORTIZ, Néstor. Informe sobre el estado de la biodiversidad en Colombia 2006-2007. *Instituto de Investigaciones de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá*, 2008.
- ROSA, P.T. V.; PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ, B.; SMITH, R. L. Jr.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L.J.; PETERS, C.J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M. (Ed). Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. En: MEIRELES, M. *Extracting bioactive compounds for food products: Theory and applications*. Boca Raton, FL.: CRC PRESS LLC (2009); p. 269-288. ISBN 978-1-4200-6237-3
- SAJAB, Mohd Shaiful, et al. Alkaline-treated cocoa pod husk as adsorbent for removing methylene blue from aqueous solutions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2013, vol. 1, no 3, p. 460-465.
- SALGIN, Uğur. Extraction of jojoba seed oil using supercritical CO<sub>2</sub>+ ethanol mixture in green and high-tech separation process. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2007, vol. 39, no 3, p. 330-337.
- SIES, Helmut; STAHL, Wilhelm. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American journal of clinical nutrition*, 1995, vol. 62, no 6, p. 1315S-1321S.
- SIMÕES, C. M. O.; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 1999.
- SIERRA PRADA, Leidy Johanna; PEÑARANDA HERRERA, Jerson Duvan. Evaluación de la actividad antioxidante, contenido de polifenoles y

- metilxantinas en materiales de cacao colombianos. Trabajo de pregrado para obtener el título de químico. *Universidad Industrial de Santander*, 2013
- TALANSIER, Emeline, et al. Supercritical fluid extraction of vetiver roots: A study of SFE kinetics. *The Journal of Supercritical Fluids*, 2008, vol. 47, no 2, p. 200-208.
- TREYBAL, Robert Ewald; TREYBAL ROBERT, E. *Mass-transfer operations*. New York: McGraw-Hill, 1968.
- UNTEN, S., et al. Effect of cacao husk extract on human immunodeficiency virus infection. *Letters in applied microbiology*, 1991, vol. 13, no 6, p. 251-254.
- VRIESMANN, Lúcia Cristina; TEÓFILO, Reinaldo Francisco; PETKOWICZ, Carmen Lúcia de Oliveira. Optimization of nitric acid-mediated extraction of pectin from cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.) using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 2011, vol. 84, no 4, p. 1230-1236.
- WANG, Lijun; WELLER, Curtis L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 2006, vol. 17, no 6, p. 300-312.
- WONGKITTIPONG, Rutchadaporn, et al. Solid–liquid extraction of andrographolide from plants—experimental study, kinetic reaction and model. *Separation and Purification Technology*, 2004, vol. 40, no 2, p. 147-154.



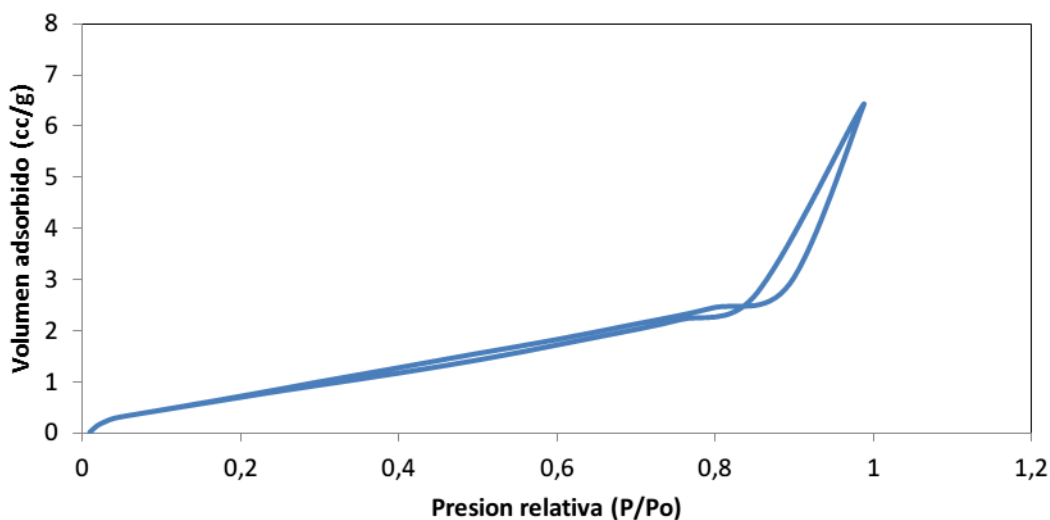
### Anexo B. Curva de secado de la cáscara de cacao (clon CC-51)



## Anexo C. Protocolos de caracterización física y química

- Determinación de las propiedades texturales de las partículas de cáscara de cacao

Este procedimiento se realizó mediante el análisis de las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno, utilizando el equipo ANOVA 1200 de Quantachrome y siguiendo el procedimiento descrito por [Hernández \(2013\)](#). El área específica ( $A_{BET}$ ) se determinó con base en la teoría de Brunauer, Emmett y Teller (BET); el volumen de poro (VP) y el diámetro promedio de poro (DP) se calcularon utilizando el método Barrett, Joyner y Halenda (BJH). Antes de cada prueba la muestra (0,2 g) fue desgasificada al vacío durante 12 h a 363,15 K. A continuación se presenta la isoterma de adsorción-desorción obtenida para la cáscara de cacao.



- Extracción sólido-líquido para la determinación del contenido de polifenoles y flavan-3-oles presentes en la cáscara de cacao

Metodología descrita por [Perea-Villamil et al., \(2009\)](#) para la extracción de polifenoles y flavan-3-oles. Inicialmente, se mezcló 1 g de muestra de cáscara de

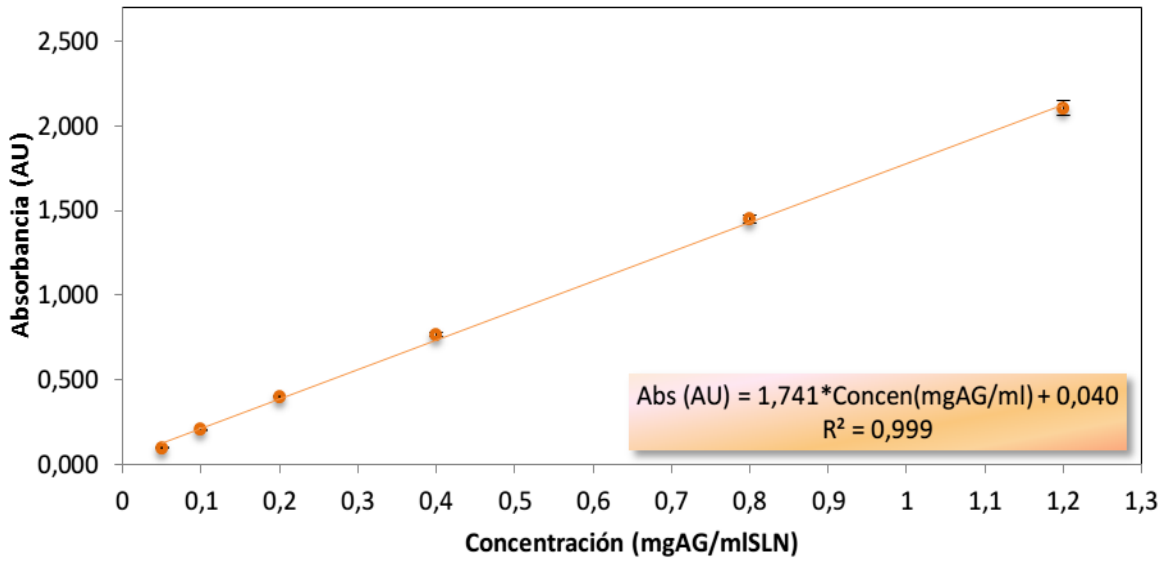
cacao con 20 ml de una solución etanol: agua (80:20, v/v). Para llevar a cabo el proceso de extracción se acondiciono el sistema a una temperatura no mayor a 60 °C (para evitar degradación térmica de los compuestos) y agitación constante durante 15 min. Posteriormente, la muestra se dispuso en un tubo falcón, y fue sometida a una separación de fases mediante centrifugación a 3500 rpm durante 15 min a 25 °C. Para remover las trazas de sólidos suspendidos, el sobrenadante de la mezcla se pasó a través de papel filtro, repitiéndose el procedimiento varias veces. El extracto obtenido se almaceno en un vial de vidrio color ámbar a 4°C hasta su uso (tiempo no mayor a 5 días).

- Extracción sólido-líquido para la determinación del contenido de carotenoides presentes en la cáscara de cacao

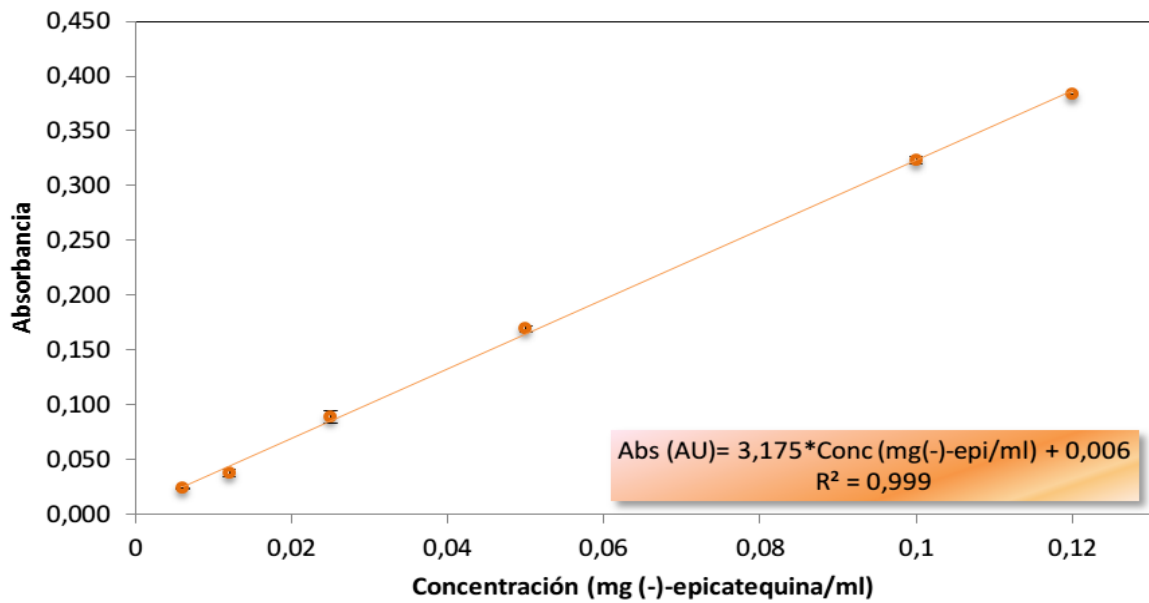
Metodología descrita por (Kao *et al.*, 2012) para la extracción de carotenoides. Inicialmente, se mezcló 1 g de muestra de cáscara de cacao con 30 ml de una solución de hexano / etanol / acetona / tolueno (10:6:7:7, v/v/v/v); por lo tanto, es necesario agitar la mezcla durante aproximadamente 1 hora. Posteriormente, para llevar a cabo el proceso de saponificación se añadió 5 ml de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 40%, dejándose la mezcla en reposo bajo nitrógeno a condiciones de oscuridad durante 16 h. Al cabo de este tiempo, se añadió 15 ml de hexano y se agitó durante 10 min. Seguidamente, se adicionó 15 ml de una solución de sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 10%, se agito durante 1 min y se recogió el sobrenadante de la mezcla. Al residuo se le adiciono 15 ml de hexano y se agitó durante 10 min hasta volverse incoloro. Este procedimiento se repitió varias veces con el fin de retirar la mayor cantidad de sobrenadante posible.

## Anexo D. Curvas de calibración

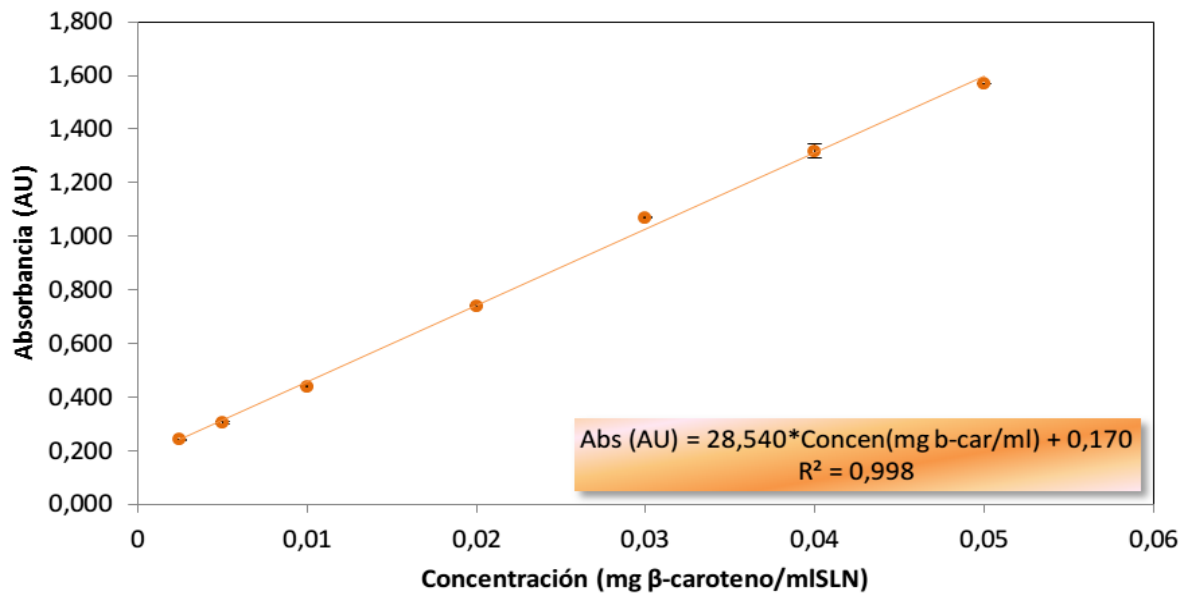
- Curva de calibración de ácido gálico



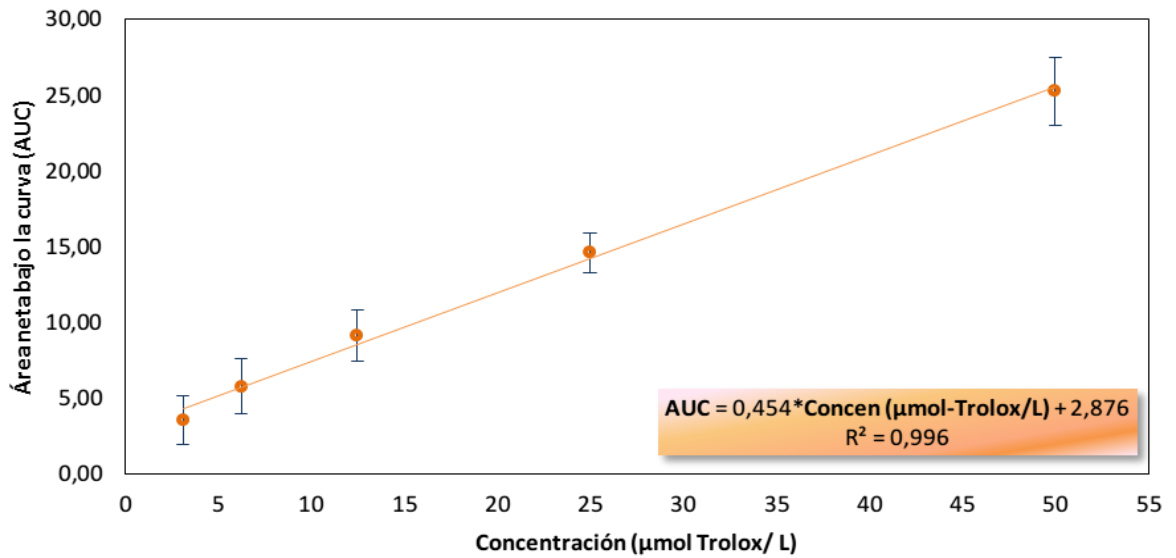
- Curva de calibración de (-)-epicatequina



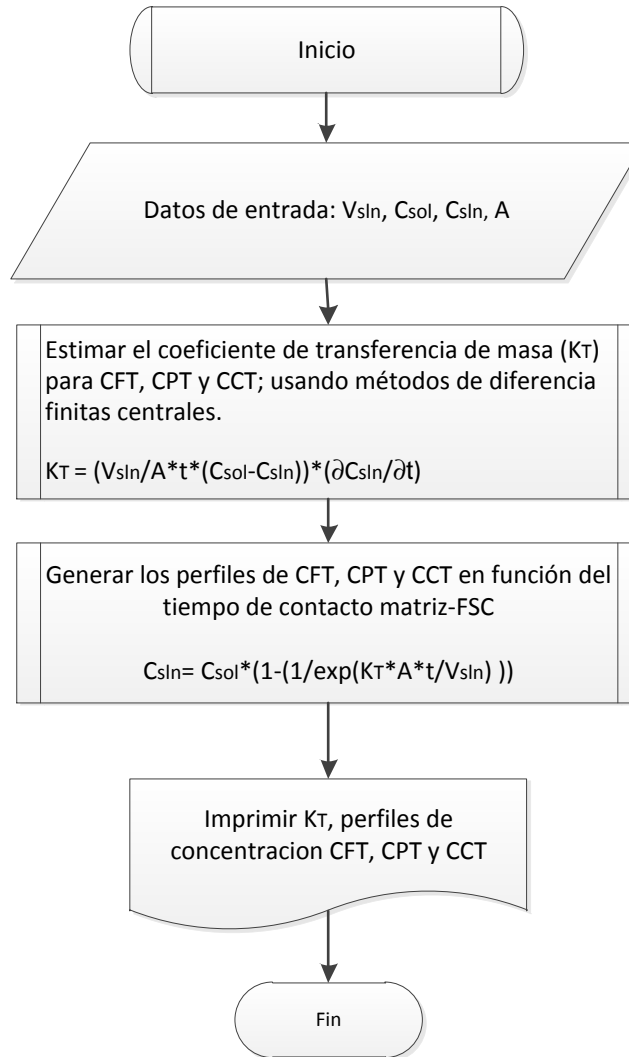
- Curva de calibración de  $\beta$ -caroteno



- Curva de calibración de Trolox



Anexo E. Algoritmo de cálculo implementado para resolver el modelo



**Anexo F. Rendimientos de extracción, contenido de polifenoles, flavan-3-oles y carotenoides totales, y valores ORAC cuantificados en los extractos**

Tiempo (s)	% Rend (g EL/gms)			CPT (mgAG/gEL)			CFT (mgE(-)-E/gEL)			CCT (mgE(β)-C/gEL)			ORAC (μmol ET/gEL)		
	Prom	SD	Tukey	Prom	SD	Tukey	Prom	SD	Tukey	Prom	SD	Tukey	Prom	SD	Tukey
600	1,32	0,05	(c)	18,33	1,79	(a)	6,81	0,53	(d)	3,26	0,36	(d)	439,98	6,50	(a)
1200	1,42	0,10	(c)	18,90	0,96	(a)	8,01	0,22	(b,c)	20,11	0,35	(c,d)	367,65	2,62	(a,b)
1800	1,52	0,06	(c)	20,25	2,67	(a)	8,06	0,07	(b,c)	28,22	0,23	(c,d)	322,42	17,70	(b,c)
2400	1,48	0,12	(c)	21,32	0,54	(a)	9,06	0,18	(a,b)	25,69	0,22	(c,d)	328,08	3,28	(b)
3600	1,75	0,03	(c)	21,42	0,08	(a)	9,60	0,00	(a)	34,87	0,62	(b,c)	224,71	38,93	(d,e,f)
4800	1,70	0,18	(b,c)	21,88	0,07	(a)	9,54	0,36	(a)	35,45	0,30	(a,b,c)	291,61	3,26	(b,c,d)
6000	1,90	0,02	(b,c)	20,48	3,39	(a)	9,27	0,05	(a)	36,52	0,08	(b,c)	244,29	9,88	(d,e)
7200	2,00	0,14	(a,b,c)	20,01	0,08	(a)	9,79	0,13	(a)	44,03	0,21	(a,b)	177,28	3,81	(e,f)
8400	2,21	0,24	(a,b)	21,91	0,20	(a)	9,88	0,11	(a)	46,20	0,45	(a,b)	331,10	11,28	(b)
9600	2,57	0,29	(a)	21,45	3,45	(a)	9,76	0,43	(a)	45,58	0,07	(a,b)	248,67	5,84	(c,d,e)
12000	2,99	0,17	(a,b)	17,35	0,21	(a)	7,66	0,36	(c,d)	36,17	0,14	(a,b,c)	165,19	2,28	(f)
14400	2,73	0,14	(c)	22,09	0,52	(a)	9,74	0,47	(a)	52,63	1,58	(a)	218,80	5,73	(d,e,f)