

**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)**

**JAIME JAIMES ESTÉVEZ  
SERGIO MAURICIO PICO HERNÁNDEZ**

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

**2014**

**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)**

**JAIME JAIMES ESTÉVEZ  
SERGIO MAURICIO PICO HERNÁNDEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de  
Ingeniero Químico**

**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 con todo el amor a mis padres Esther y Lucas por su gran apoyo, paciencia, entendimiento y amor que me brindaron no solo durante el desarrollo de este proyecto, sino desde el primer momento que supieron de mí.*

*A mis hermanos Leonardo y Wiligton, que siempre estuvieron ahí de manera absoluta en todo momento*

*A Mónica por su ternura, amor; su apoyo y su paciencia, por entenderme y enseñarme la fortaleza necesaria para seguir adelante.*

*Y sobre todas las cosas a Dios, que me ha brindado todo sin merecer nada, que nunca me ha desamparado y que me obsequió una familia tan increíble, que gracias a ellos todo esto fue posible.*

***Jaime Jaimes Estévez***

*A mis padres Flor y Elibardo, por darme las bases para siempre luchar por mis sueños,  
Por su apoyo incondicional y a quienes les debo todo, por ser mi ejemplo a seguir y  
mostrarme que aunque no podían darme el mundo siempre me apoyarían para que yo lo  
conquistara.*

*Todo lo que he hecho, hago y hare siempre será para que se sientan orgullosos de mí.*

*A mis hermosas hermanitas Maye, Andrea, Cindy y Candy por alegrarme la vida con sus  
aportes inocentes y convertirse en las razones para luchar en búsqueda de un mejo  
mañana.*

*Este logro es familiar en el cual yo solo he sido el conductor pero ustedes han sido el motor.*

*A Helga por acompañarme durante toda esta travesía, quien me agunto los malos genios,  
quien es estuvo en los tiempos difíciles y quien es la responsable de los momentos más  
felices de mi vida, con quien estaré agradecido de por vida por hacerme su mundo y que ella  
fuera el mío.*

*A las familias Gutiérrez Rueda y Almeida Sánchez porque con su ayuda y compañía se  
Convirtieron en mi segundo hogar y muchas veces en familia.*

*Sergio Mauricio Pico Hernández.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Industrial de Santander y particularmente a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión de por los recursos otorgados a través del Proyecto VIE-5466.

Al Instituto de Biotecnología y Agroindustria de la Universidad Nacional de Colombia por la disposición de sus equipos experimentales y cooperación en la ejecución de este trabajo.

A los Laboratorios de: Alimentos (CICTA), Catálisis (CICAT) y Operaciones Unitarias de la Universidad Industrial de Santander por facilitarnos la utilización de sus instalaciones, equipos y recursos experimentales.

Al doctor Luis Javier López Giraldo por su acompañamiento y apoyo en durante el desarrollo de este trabajo

A la ingeniera Yeimy Mabel Martínez Triana, por sus enseñanzas y compromiso a lo largo de esta investigación

A la familia supercrítica por la unión, la amistad y el buen trabajo realizado.

A nuestros padres, familiares y amigos por su gran apoyo a lo largo de este proceso.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>18</b>
<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>24</b>
2.1. DIAGRAMA METODOLÓGICO	24
2.2.1. Reactivos	24
2.2.2. Materiales y equipos:	24
2.2. ETAPA I: RECOLECCIÓN, ACONDICIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO	25
2.2.1. Recolección de los frutos de cacao:	25
2.2.2. Recuperación y pretratamiento de la cáscara de cacao:	25
2.2.3. Caracterización de la cáscara de cacao:	26
2.3. ETAPA II: DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y TIEMPO DE EXTRACCIÓN MÁS FAVORABLES PARA LA OBTENCIÓN DE POLIFENOLES	26
2.4. ETAPA III: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PRESIÓN, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN MÁSCICA DE ETANOL EN LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES, FLAVAN-3-OLES Y CAROTENOIDES TOTALES	27
2.5. ETAPA IV: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FUNCIONAL DE LOS EXTRACTOS COLECTADOS	29
2.5.1. Preservación y almacenamiento de los extractos:	29
2.5.2. Determinación del rendimiento de extracción:	29
2.5.3. Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT):	29
2.5.4. Determinación del contenido de flavan-3-oles totales (CFT):	30

2.5.5.	Determinación del contenido de carotenoides totales (CCT):	30
2.5.6.	Determinación de la capacidad antioxidante:	30
2.6.	ETAPA V: CORRELACIÓN MATEMÁTICA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN	31
2.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
3.1.	CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO	33
3.2.	TAMAÑO DE PARTÍCULA Y TIEMPO DE EXTRACCIÓN FAVORABLES PARA LA OBTENCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES A PARTIR DE CÁSCARA DE CACAO	34
3.3.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA, PRESIÓN Y CONCENTRACIÓN MÁSCICA DE ETANOL EN LOS PERFILES DE COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS	36
3.4.	CORRELACIÓN MATEMÁTICA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA	40
3.5.	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS	41
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>44</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Esquema metodológico.....	24
<b>Figura 2.</b> Montaje del equipo experimental utilizado en las extracciones supercríticas. ....	28
<b>Figura 3.</b> Superficie de respuesta para el contenido de polifenoles totales en función del tamaño de partícula y tiempo de extracción .....	35
<b>Figura 4.</b> Variación del contenido de polifenoles totales extraídos en función de la temperatura, presión y concentración másica de etanol. Los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores medios determinados para cada isoterma.....	36
<b>Figura 5.</b> Diagrama de Pareto para el contenido de polifenoles totales .....	37
<b>Figura 6.</b> Gráficos de efectos principales para el contenido de polifenoles (CPT) (a), flavan-3-oles (CFT) (b) y carotenoides (CCT) (c) totales, y rendimiento (% Rend) (d).....	38
<b>Figura 7.</b> Superficies isotérmicas para CPT (a), CFT (b), CCT (c) y rend (d).....	42

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Composición de la cáscara de cacao (clon CCN-51) .....	33
<b>Tabla 2.</b> Coeficientes de regresión estimados desde un modelo de segundo orden .....	34
<b>Tabla 3.</b> Coeficientes de correlación de Pearson .....	38
<b>Tabla 4.</b> Comparación del porcentaje de rendimiento obtenido a partir de diferentes matrices .....	40
<b>Tabla 5.</b> Parámetros y AARD de los modelos empíricos.....	41

## LISTA DE ANEXOS

	Página
<b>Anexo A.</b> Estructura genérica de los polifenoles y flavan-3-oles .....	54
<b>Anexo B.</b> Curva de secado de la cáscara de cacao (Clon CCN-51).....	55
<b>Anexo C.</b> Protocolos de caracterización de la cáscara de cacao (clon CCN-51) ....	56
<b>Anexo D.</b> Curvas de calibración.....	58
<b>Anexo E.</b> Variación del contenido de polifenoles en función del tamaño de partícula y tiempo de extracción.....	60
<b>Anexo F.</b> Prueba de Tukey para el diámetro de partícula y tiempo de extracción .	61
<b>Anexo G.</b> Compuestos cuantificados para las isotermas de extracción .....	62
<b>Anexo H.</b> Análisis de varianza ANOVA.....	63
<b>Anexo I.</b> Diagramas de Pareto .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS

AARD	Desviación absoluta relativa promedio
CCT	Concentración de carotenoides totales
CFT	Concentración de flavan-3-oles totales
CPT	Concentración de polifenoles totales
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CO <sub>2</sub> -sc	Dióxido de carbono supercrítico
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EBC	Equivalentes de β-caroteno
EEP	Equivalentes de (-)-epicatequina
EL	Extracto liofilizado
ET	Equivalentes de Trolox
FSC	Fluido supercrítico
P	Presión
P <sub>c</sub>	Presión crítica
T	Temperatura
T <sub>c</sub>	Temperatura crítica
<i>t<sub>ext</sub></i>	Tiempo de extracción
<i>T<sub>p</sub></i>	Tamaño de partícula
X	Concentración másica de etanol
<i>x</i>	Valores de las variables independientes
<i>y</i>	Valores de la variable dependiente

## RESUMEN

**TÍTULO:** 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).\*

**AUTORES:** JAIME JAIMES ESTÉVEZ, SERGIO MAURICIO PICO HERNÁNDEZ.\*\*

**PALABRAS CLAVE:** SUPERCRÍTICO, DIÓXIDO DE CARBONO, POLIFENOLES, EXTRACTOS, ANTIOXIDANTES NATURALES.

### DESCRIPCIÓN:

La extracción con dióxido de carbono supercrítico y etanol es una técnica con gran proyección para la obtención de compuestos naturales. Sin embargo, la estructura de algunas matrices vegetales varía en función de cada material, evidenciando la necesidad de conocer la influencia de algunos parámetros antes de su implementación. En este trabajo se estudió el efecto del tamaño de partícula, tiempo de extracción, temperatura, presión y concentración másica de etanol en la obtención de extractos polifenólicos a partir de cáscara de cacao (clon CCN-51). La influencia del tamaño de partícula (0,223–1,785mm) y tiempo de extracción (40-200min) se evaluó utilizando la metodología de superficie de respuesta. El efecto de la temperatura (308,15; 313,15 y 318,15 K), presión (10, 15 y 20 MPa) y concentración másica de etanol (2, 11 y 20%) se determinó a través del análisis ANOVA. Además se estudió la variación del contenido de flavan-3-oles y carotenoides totales, así como la capacidad antioxidante del extracto más rico en polifenoles. Los perfiles de composición se cuantificaron por espectrofotometría y la capacidad antioxidante mediante el ensayo ORAC. Los resultados sugieren que tamaños de partícula menores a 1,11mm y tiempos de extracción superiores a 147,18min favorecen la obtención de extractos polifenólicos. Asimismo, se encontró para 308,15 K, 20 MPa y 20 % de etanol, una concentración de polifenoles, flavan-3-oles y carotenoides totales de 35,11 mgEAG/gEL, 12,89 mgEEP/gEL y 64,35 mgEBC/gEL respectivamente, con valor ORAC de 489,58  $\mu\text{molET/gEL}$ . Los perfiles de concentración se describieron mediante modelos matemáticos con AARD < 12,20%.

---

\* Trabajo de grado

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

## ABSTRACT

**TITLE:** PRELIMINARY STUDY OF THE INFLUENCE OF THE MAIN PARAMETERS EXTRACTION USING SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE AND ETHANOL. CASE OF STUDY: OBTAINING POLYPHENOLS AND CAROTENOIDS FROM COCOA HUSK (CLONE CCN-51).\*

**AUTHOR:** JAIME JAIMES ESTÉVEZ, SERGIO MAURICIO PICO HERNÁNDEZ.\*\*

**KEYWORDS:** SUPERCRITICAL, CARBON DIOXIDE, POLYPHENOLS, EXTRACTS, NATURAL ANTIOXIDANTS.

### DESCRIPTION:

Extraction with supercritical carbon dioxide and ethanol is a technique with great potential to the obtainment of antioxidants from vegetable matrices, whose structure often varies among different materials, highlighting the need to know the influence of some parameters before implementation. Consequently, in this work the effect of particle size, extraction time, temperature, pressure and mass concentration of ethanol in the obtaining of polyphenolic extracts from cocoa husks (clone CCN-51) was studied. The influence of particle size (0.223-1.785 mm) and extraction time (40-200 min) was evaluated using the response surface methodology. The effect of temperature (308.15, 313.15 and 318.15 K), pressure (10, 15 and 20 MPa) and mass concentration of ethanol (2, 11 and 20%) was determined with the ANOVA analysis. Furthermore was studied the variation of the total content of flavan-3-ols and carotenoids as well as the antioxidant capacity of the extract with higher content of polyphenols. The composition profiles were determined by spectrophotometry and antioxidant capacity with the hydrophilic ORAC assay. The results suggest that particle sizes less than 1.11 mm and times upper 147.18 min can obtain mayor extraction of polyphenol compounds. It was also found for 308.15 K, 20 MPa and 20% ethanol, a concentration of polyphenols, flavan-3-ols and total carotenoids of 35.11 mg GAE/ g LE, 12.89 mg EPE/g LE and 64.35 mg BCE /g LE respectively. These extracts exhibited an ORAC value of 489.58  $\mu\text{mol ET/ g LE}$ . Finally, all concentration profiles were described by mathematical models with AARD values under 12.20%.

---

\* Bachelor thesis

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

## INTRODUCCIÓN

Ante las crecientes preocupaciones ambientales y la acentuada preferencia de los consumidores por productos cada vez más seguros y de origen natural, los fluidos supercríticos (FSC) están siendo identificados como potenciales sustitutos de los solventes orgánicos convencionales. En este sentido, numerosas investigaciones han encontrado que los FSC son capaces de proporcionar extractos naturales con mayor bioactividad y alta calidad, excluyendo cualquier toxicidad y atendiendo los controlados estándares de seguridad fijados en la industria alimenticia, cosmética y farmacéutica (Jun *et al.*, 2012; Herrero *et al.*, 2010).

A nivel industrial, el uso de FSC ha logrado extenderse en más de 30 plantas de procesamiento alrededor del mundo (King *et al.*, 2000). En países como Alemania, estos solventes han ofrecido la posibilidad de diseñar procesos selectivos, entre los que se destaca la extracción de la cafeína del té y del café (Brunner, 2004). Asimismo, algunas compañías internacionales de gran trayectoria como *Valensa Corporation* (España), *KD Pharma* (Estados Unidos), *UMAX Co.* (Korea), *Ottogi* (Korea) y *NATEX* (Austria) están demostrando que los FSC son una herramienta con un amplio espectro de posibilidades en la obtención y purificación industrial de extractos y productos naturales (King, 2014; Brunner, 2010).

Se estima que durante los últimos 13 años (2000-2013) más de 300 especies vegetales han sido evaluadas a escala laboratorio para obtener extractos usando FSC (de Melo *et al.*, 2014). Al respecto, es importante señalar que estos trabajos se han enfocado en el aprovechamiento de biomasa tanto vegetal como residual (Brunner 2010). En Colombia por ejemplo, existen varios estudios, concluidos y en proceso, que evalúan esta técnica para la obtención de productos con valor agregado a partir de mora (*Rubus glaucus* Benth) (Cerón *et al.*, 2012), mango (*Mangifera indica* L.) (García *et al.*, 2012), chontaduro (*Bactris gasipaes*) (Espinosa *et al.*, 2014), piña (*Ananas comosus*) (Sánchez *et al.*, 2013), romero, salvia y guayaba (*Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava*) (Arias & Ramírez, 2012), entre otros.

En general, los anteriores estudios están proyectando con gran éxito la extracción supercrítica a nivel nacional. No obstante, el territorio Colombiano cuenta con una amplia disponibilidad de recursos que aún no han sido explorados. En este sentido, es de resaltar que Colombia es un país tropical con un alto potencial de producción a partir del sector primario, en donde productos como el café, la palma de aceite, el algodón y el cacao, son de gran tradición ([Proexport, 2012](#)) y su procesamiento deja en evidencia la generación de altos volúmenes de residuos.

Particularmente, el cultivo de cacao en Colombia es una actividad que registra una producción de más de 42294 toneladas anuales ([Martínez-Covaleda, 2005](#)). Asimismo, en el mercado mundial, este fruto se posiciona en el tercer lugar después del azúcar y el café ([SIC, 2012](#)). En promedio un árbol de cacao puede generar entre 10 y 15 frutos por cosecha. Normalmente, el índice de grano, su calidad y rendimiento suelen verse fuertemente influenciados por el clon cultivado, así como por las características agronómicas del lugar de recolección ([Carrillo et al., 2013](#)). Bajo este concepto, la Federación Nacional de Cacaoteros de Colombia (FEDECACAO) entre 2002 y 2012 evaluó cerca de 500 árboles y de éstos seleccionó 67 clones promisorios, entre los que se encuentra el CCN-51 (Colección Castro Naranjal, variedad ICS 95\*IMC 67, origen ecuatoriano; [Perea et al., 2013](#)). Este clon se ha destacado por ofrecer altos rendimientos, ser tolerante a las enfermedades y proveer granos homogéneos y de gran tamaño ([Monsalve et al., 2005](#)). En consecuencia, su cultivo se ha extendido a través del territorio Colombiano, desplazando a otras variedades tradicionales.

De manera general, la cadena productiva del cacao en Colombia se puede clasificar en tres eslabones, los cuales sólo centran su atención en la producción, procesamiento y comercialización del grano ([SIC, 2013](#)). Es por esto que ante la ausencia de alternativas que promuevan la utilización de los demás componentes (mucílago, cáscara y cascarilla), la mayoría de ellos son desechados y calificados como residuos vegetales. Considerando que del peso total del fruto, sólo el 25 % es grano, en 2010 FEDECACAO estimó que la generación nacional de cáscara podría llegar a alcanzar un volumen de unas 30000 toneladas anuales ([Jaimes &](#)

[Aranzazu, 2010](#)). Asimismo a nivel mundial, se prevé que cada tonelada de grano seco generará 10 toneladas de cáscara en base húmeda ([Vriesmann et al., 2011](#)).

Desde un punto de vista químico y funcional, el árbol de cacao se ha considerado una especie vegetal rica en polifenoles, principalmente catequinas, epicatequinas y sus dímeros y oligómeros ([Wollgast & Anklam, 2000](#)). Para el caso particular de la cáscara, es importante señalar que de su peso total un 75,3 % es agua ([Lim, 2011](#)). No obstante, varios trabajos revelan que este material posee un considerable contenido de fibra (36,6 %), lípidos (1,5 %), azúcares (30,55 %), micronutrientes (1 %), macronutrientes (2,89 %), y algunos compuestos bioactivos tales como metilxantinas, polifenoles, taninos, pigmentos (como clorofilas y carotenoides) y constituyentes volátiles ([Vriesmann et al., 2011](#); [Boheví & Benería 1998](#)).

En consecuencia, estudios realizados principalmente en Brasil, Ecuador, Malasya y España han aprovechado el contenido de fibra dietaria y proteína de la cáscara de cacao para: *i*) la formulación de alimentos de consumo animal ([Ramos et al., 2008](#)), *ii*) la recuperación de pectinas ([Chan & Choo, 2013](#)) y azúcares ([Boheví & Benería 1998](#)), y *iii*) la obtención de capas adsorbentes ([Pua et al., 2013](#)) para remover sustancias contaminantes en fuentes hídricas. Sin embargo, la literatura reporta muy poca información acerca de la obtención de extractos con valor funcional y nutricional a partir de la cáscara de cacao. Por lo tanto, considerando que en el reino vegetal se distribuyen un gran número de compuestos con propiedades antioxidantes, la implementación de la extracción supercrítica puede proyectarse como una alternativa para otorgar un mayor valor agregado a este residuo, y generar amplias perspectivas de desarrollo en la cadena del cacao.

De manera general, una extracción supercrítica es definida como un proceso no convencional, análogo a la lixiviación o extracción sólido-líquido, y caracterizado por trabajar con solventes a condiciones de temperatura y presión superiores a las de su punto crítico ([Meireles, 2009](#)). Como agente disolvente en este tipo de procesos es común utilizar dióxido de carbono supercrítico (CO<sub>2</sub>-sc). Este FSC es inerte y posee un punto crítico moderado (T<sub>c</sub>=304,2 K, P<sub>c</sub>=7,38 MPa), propiedades

que lo convierten en una alternativa ideal para el procesamiento de compuestos con valor funcional y nutracéutico (Martínez, 2007). Asimismo, el CO<sub>2</sub>-sc se identifica por poseer una densidad cercana a la de los líquidos, una viscosidad intermedia y una difusividad similar a la de los gases (Brunner, 1994). Las anteriores particularidades le confieren amplias posibilidades de uso en procesos de transferencia de masa.

Es bien sabido que el producto final de todo proceso de extracción generalmente es una fracción líquida o sólida constituida por un sin número de compuestos. En efecto, un extracto es la mezcla de todos aquellos componentes que contenidos en una matriz orgánica (e.g. cáscara de cacao) lograron presentar afinidad con el solvente y finalmente fueron extraídos (de Melo *et al.*, 2014). Por lo tanto, la mayoría de estudios relacionados con este tema suelen enfocarse en definir condiciones favorables para la obtención de extractos con mayor contenido de uno u otro componente.

En la actualidad es posible identificar un creciente interés en la obtención de extractos con alto contenido de antioxidantes, particularmente polifenoles y carotenoides. Los polifenoles son metabolitos secundarios que se caracterizan por poseer dentro de su estructura uno o más anillos fenólicos en los que se ubican grupos hidroxilo (OH). Estos compuestos poseen una alta diversidad estructural y pueden ser divididos en dos subgrupos mayoritarios: los flavonoides y los no flavonoides. Los flavonoides comparten un esqueleto común (C6-C3-C6) y en entre ellos se encuentran las flavanonas, flavan-3-oles, flavonas, entre otros. Por otro lado, los no flavonoides están representados por ácidos fenólicos simples, como el ácido gálico, protocatéquico, cinámico y sus derivados (López-Giraldo, 2008). Generalmente, la capacidad antioxidante de estos compuestos se relaciona con sus grupos OH, los cuales, confieren la particularidad de actuar como neutralizadores de radicales libres (Bravo, 2000). Asimismo, los carotenoides son metabolitos secundarios reconocidos por poseer ocho grupos isoprenoides (C5), precursores de la vitamina A, con alta capacidad antioxidante y responsables de la pigmentación de varios alimentos. En este último grupo se han clasificado los

carotenos, licopenos, xantofilas, entre otros ([Rodríguez-Amaya, 2001](#)), algunas estructuras son presentadas en el Anexo A).

Muchas de las veces, la naturaleza química de los compuestos de interés y de la matriz de extracción son una información básica para definir las condiciones de operación de toda extracción supercrítica. Entre los principales factores que deben evaluarse en este proceso, se encuentra el efecto de la temperatura, presión, concentración de cosolvente, tiempo de extracción y tamaño de partícula ([Martínez, 2007](#)).

En este contexto es importante señalar que el poder de solvatación de todo FSC se ve fuertemente influenciado por su densidad; la cual se identifica como un parámetro dependiente de la temperatura, presión y polaridad del FSC ([Brunner, 1994](#)). De manera general, los incrementos de temperatura generan una disminución en la densidad del FSC, provocando una reducción significativa en la solubilidad de algunos componentes, lo que a su vez se traduce en bajos rendimientos ([Martínez, 2007](#)). Las temperaturas más regulares de experimentación oscilan entre los 303,15 y 383,15 K ([de Melo et al., 2014](#)). No obstante, cuando la meta es extraer compuestos bioactivos, se debe cuidar que éstas no superen los 333,15 K ([Azmir et al., 2013](#)), para evitar así su degradación térmica.

Por otro lado, los incrementos en la presión generan aumentos considerables en la densidad del FSC, mejorando su poder de solvatación y promoviendo una mayor solubilización de los compuestos de interés ([Gupta & Shim, 2007](#)). En la mayoría de estudios, las presiones de operación varían entre 10 y 80 MPa ([de Melo et al., 2014](#)). Sin embargo, el intervalo de experimentación suele limitarse por la ausencia de equipos capaces de operar a altas presiones ([King, 2014](#)).

Debido a que el CO<sub>2</sub>-sc es uno de los FSC más usados y que a su vez posee una polaridad relativamente baja, varios estudios han introducido el uso de cosolventes para modificar su poder de solvatación, y promover la extracción de compuestos polares. Con este fin se han evaluado cerca de 17 cosolventes, no obstante, el

etanol (en concentraciones menores al 25 %) es la sustancia con mayor grado de aceptación para la extracción de productos naturales destinados al consumo humano (Lang & Wai, 2001). Este cosolvente posee una baja toxicidad, y se elimina con facilidad de los extractos, mediante evaporación atmosférica o al vacío.

Igualmente, el tiempo y el tamaño de partícula son parámetros críticos en los procesos de extracción. En este contexto, es imperativo trabajar con tiempos de extracción que garanticen la interacción entre la matriz y el FSC, y a la vez, permitan la adecuada saturación de la fase fluida (Kha *et al.*, 2014). Al respecto, la literatura reporta tiempos que van desde 4 min hasta 6 horas (Martínez, 2007). Con relación al tamaño de partícula, es frecuente experimentar entre 0,10 y 3,0 mm (Boye & Arcand, 2012). No obstante, es necesario definir un intervalo sobre el cual, el FSC interactúe con una mayor área superficial de la matriz (Zou., *et al* 2008).

De manera general, la constitución y estructura de las matrices orgánicas varía notablemente entre un material y otro. En consecuencia, muchas de las veces no es posible generalizar las condiciones de extracción y se hace necesario evaluar para cada matriz el efecto de los factores anteriores al implementar una extracción supercrítica.

En consideración de lo expuesto, el objetivo de este trabajo es estudiar y correlacionar la influencia del tiempo de extracción, tamaño de partícula, temperatura, presión y concentración másica de etanol en la obtención de extractos con alto contenido de polifenoles totales a partir de la cáscara de cacao del clon CCN-51, usando como solventes CO<sub>2</sub>-sc + etanol. Asimismo, en este estudio se optó por: *i*) evaluar el contenido de flavan-3-oles y carotenoides totales con el fin de obtener mayor información de los perfiles de composición de los extractos, y *ii*) cuantificar la capacidad antioxidante del extracto con mayor contenido de polifenoles totales.

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”.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. DIAGRAMA METODOLÓGICO

En la **Figura 1** se presenta la secuencia metodológica implementada en esta investigación. Para efectos ilustrativos, en los siguientes apartados se resumen los reactivos y materiales utilizados, así como los procedimientos efectuados.

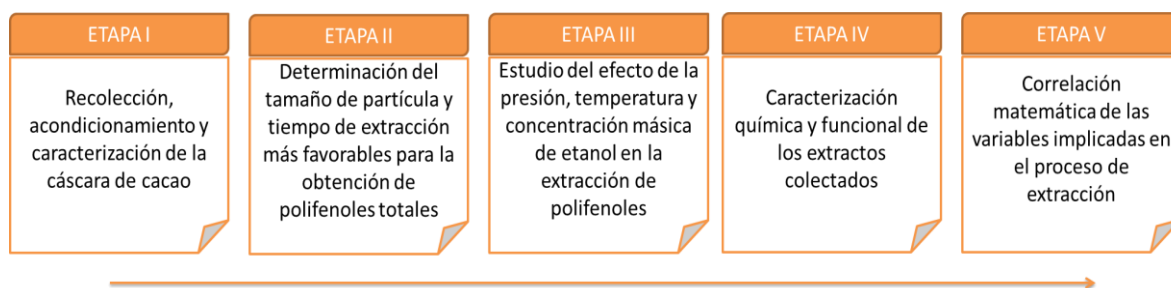


Figura 1. Secuencia metodológica

### 2.2. REACTIVOS Y MATERIALES.

2.2.1. Reactivos: Dióxido de carbono (99,9 % v/v) de Linde Colombia S.A. (Bogotá, Colombia). Etanol absoluto (99,9 % v/v), metanol (99,9 % v/v), ácido gálico (99,9 % p/p), (-)-epicatequina (99,0 % p/p),  $\beta$ -caroteno (99,9 % p/p), vainillina (99,9 % p/p), reactivo de Folin-Ciocalteu (99,9 % v/v), carbonato de sodio (99,9 % p/p), ácido clorhídrico (1,2 N) de Merck (Darmstadt, Alemania); e hipoclorito de sodio (13 % v/v) de Suquim Ltda. (Bucaramanga, Colombia). Trolox (99,9 % p/p), fluoresceína disodio y AAPH de Sigma-Aldrich (St. Louis, EE.UU).

2.2.2. Materiales y equipos: Molino de cuchillas (Thomas Willey Mill, modelo 2 4275-H), molino de anillos, estufa (WTC Blinder), serie de tamices (WS-Tyler, modelo RX-24), empacadora al vacío (Oster, modelo V2040), rotoevaporador (Büchi, modelo R-210), liofilizador (SP Scientific, AdVantage Plus Freeze Dryers, modelo Wizard 2,0), espectrofotómetro (Thermo Spectronic, modelo GENESYS 20), balanza analítica (Ohaus, modelo PA214), agitador de vórtice (Heidolph Reax Top, modelo 036130000), espectrofluorímetro (Fluoroskan, modelo Ascent 2.6).

## 2.2. ETAPA I: RECOLECCIÓN, ACONDICIONAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO

2.2.1. Recolección de los frutos de cacao: Se seleccionaron 60 frutos del clon CCN-51 de la cosecha comprendida entre octubre de 2013 y enero de 2014. La recolección se llevó a cabo en tres fincas de diferentes regiones del departamento de Santander, Colombia: La Victoria (Rionegro, altitud<sub>prom</sub>: 708 msnm, T<sub>prom</sub>: 298,15 K), Villa Mónica (San Vicente de Chucurí, altitud<sub>prom</sub>: 693 msnm, T<sub>prom</sub>: 300,15 K) y Lebrija (Lebrija, altitud<sub>prom</sub>: 1086 msnm, T<sub>prom</sub>: 297,15 K). Todos los frutos se recogieron de árboles diferentes, cuidando de seleccionar los que presentaron características similares (longitud<sub>prom</sub> de 22,13 cm, diámetro<sub>prom</sub> de 9,26 cm, peso<sub>prom</sub> de 965,28 g) y grado de madurez fisiológica homogéneo (24 semanas). Una vez cortados del árbol, los frutos fueron cubiertos con papel y almacenados a 278,15 K en una nevera portable de poliestireno.

2.2.2. Recuperación y pretratamiento de la cáscara de cacao: En todos los casos, los frutos fueron acondicionados en un tiempo no mayor a 3 horas, contadas a partir del momento de su recolección. Brevemente, éstos fueron lavados y desinfectados de forma manual, utilizando una solución de hipoclorito de sodio (0,05 % v/v) y cortados longitudinalmente en 8 secciones de igual tamaño para aislar la cáscara de los demás componentes. Los granos, la pulpa y el mucílago se removieron de forma manual utilizando una espátula de aluminio. La cáscara recuperada fue sometida a un segundo proceso de corte (trozos de aproximadamente  $2,00 \pm 0,50 \text{ cm}^3$ ) y a un tratamiento térmico de dos etapas para evitar su posible oxidación e inhibir la acción de la enzima polifenoloxidasas ([Sierra & Peñaranda, 2013](#)). Este procedimiento se realizó siguiendo la metodología sugerida por [Alzamora et al. \(2004\)](#). En la primera etapa de la inhibición, aproximadamente 1000 g de trozos de cáscara de cacao se colocaron en contacto con  $2000 \text{ cm}^3$  de agua a  $368,15 (\pm 3,15) \text{ K}$  en un reactor enzimático durante 5 min. En la segunda etapa, los trozos se sumergieron en cubetas de agua fría a  $274,15 (\pm 4,15) \text{ K}$  durante 20 min.

El secado se llevó a cabo a 323,15 ( $\pm 3$ ) K empleando una estufa con sistema de recirculación de aire, durante 26 horas, tiempo durante el cual el material alcanzó peso constante (para mayor detalle, en el Anexo B se presenta la curva que describe la cinética de secado de esta matriz). Finalmente, el tamaño del material se redujo empleando un molino de cuchillas. Con el fin de minimizar las pérdidas, la fracción retenida sobre el mesh 42 de la serie de Tyler, se sometió a una segunda molienda utilizando un molino de anillos. Como resultado final de este proceso, se obtuvo un material particulado, que se almacenó en paquetes de 122,0 ( $\pm 0,1$ ) g, empacados al vacío, cubiertos con papel aluminio y refrigerados a 278,15 K hasta su uso.

2.2.3. Caracterización de la cáscara de cacao: El material se sometió a una caracterización física y química. La caracterización física se basó únicamente en la determinación del diámetro de partícula promedio empleando el método sugerido por la *American Society of Association Executives* (ASAE, 1996). Mientras que la caracterización química involucró: *i*) la evaluación 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 y 962,09 de la *Official Analytical Chemists Association* (18<sup>th</sup> Ed. AOAC, 1996), y *ii*) la determinación del contenido de polifenoles (CPT), flavan-3-oles (CFT) y carotenoides (CCT) totales. El CPT y CFT se estimó a través de extracciones sólido-líquido en medio polar, siguiendo la metodología propuesta por Cadena & Herrera (2008). Asimismo, el CCT se evaluó por extracción sólido-líquido en medio apolar, siguiendo la metodología sugerida por Wang *et al.* (2010). Estos procedimientos se encuentran resumidos en el anexo C.

### **2.3. ETAPA II: DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA Y TIEMPO DE EXTRACCIÓN MÁS FAVORABLES PARA LA OBTENCIÓN DE POLIFENOLES**

La influencia del tamaño de partícula ( $T_p$ ) y el tiempo de extracción ( $t_{ext}$ ) sobre el CPT se evaluó utilizando un diseño factorial  $2^2$  + punto central + puntos axiales

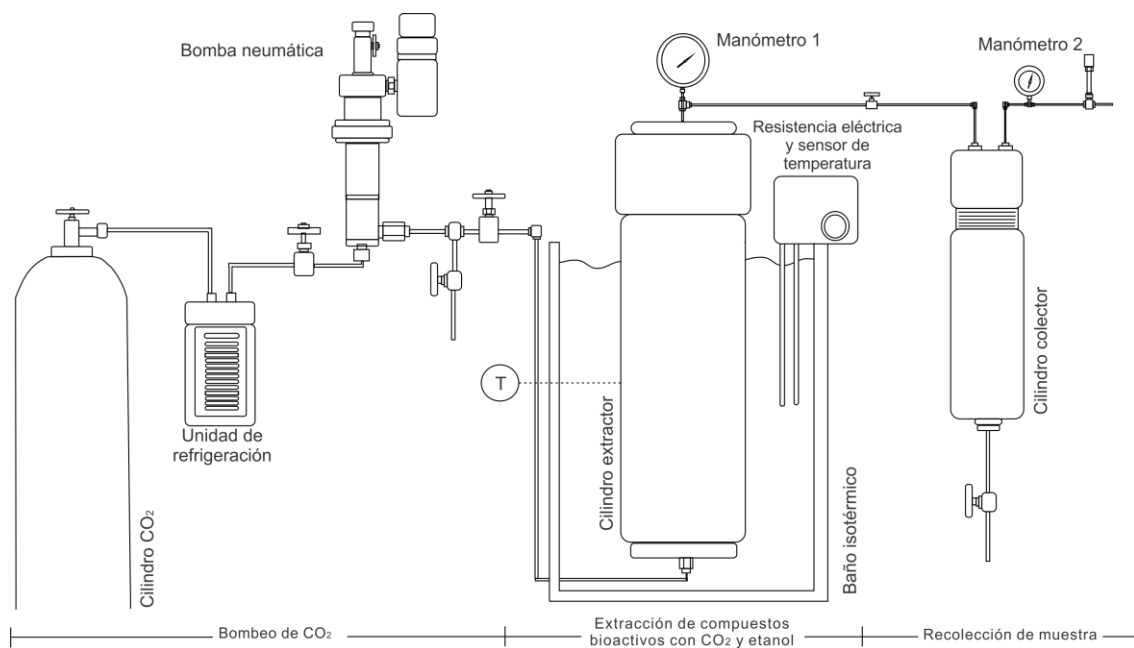
centrados en las caras, y se analizó empleando la metodología de superficie de respuesta. Con base en los resultados reportados para otros materiales por [Martínez \(2007\)](#) y [Boye & Arcand \(2012\)](#), los 3 niveles de tamaño de partícula y tiempo de extracción fueron: mesh -50/+100 (~0,223 mm), mesh -16/+40 (~0,677 mm) y mesh -8/+14 (~1,785 mm); y 40, 120 y 200 min, respectivamente. Con fines de comparación, todo el diseño se efectuó a condiciones constantes de temperatura para superar el punto crítico, presión para evitar la presión ([Matricardi et al., 2002](#)) crossover y concentración másica de etanol para tener un valor intermedio de: 308,15 K, 10 MPa y 11 % de etanol, respectivamente. Los puntos factoriales y axiales del diseño se evaluaron una única vez y el punto central se valoró por triplicado.

#### **2.4. ETAPA III: ESTUDIO DEL EFECTO DE LA PRESIÓN, TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN MÁSCICA DE ETANOL EN LA EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES, FLAVAN-3-OLES Y CAROTENOIDES TOTALES**

Las extracciones se realizaron con el tamaño de partícula y tiempo determinados como favorables en la etapa inmediatamente anterior. Todas las corridas experimentales fueron desarrolladas al menos por duplicado, construyendo isotermas de extracción a 308,15; 313,15 y 318,15 K para presiones entre 10, 15 y 20 MPa. Para cada punto de presión, la concentración másica de etanol se varió a 2, 11 y 20 %. Los límites superiores de operación se fijaron teniendo en cuenta las condiciones a las que los compuestos de interés se desnaturalizan ([Martínez et al., 2009](#)), así como las características de operación de la unidad de extracción. La concentración másica de etanol utilizada se fijó en base a estudios previos realizados por [Berna et al. \(2000\)](#) con el fin de observar el efecto de concentraciones bajas (2 %) y altas (20 %) de cosolvente.

Las extracciones supercríticas de la etapa II y III se realizaron utilizando la unidad de fluidos supercríticos diseñada y construida por el Instituto de Biotecnología de Agroindustria (IBA) de la Universidad Nacional de Colombia sede Manizales, presentada en la **Figura 2** y siguiendo la metodología propuesta por [Cerón \(2013\)](#). Brevemente una muestra de 60,0 g de cáscara de cacao se

depositó al interior de un cilindro extractor de 250 cm<sup>3</sup>. El etanol se adicionó de forma manual (2, 11 y 20 %) sobre la masa de extracción. Luego, el sistema se selló y presurizó con dióxido de carbono (hasta 10, 15 y 20 MPa) utilizando una bomba neumática (Williams-Milton Roy, modelo CP250V225). La temperatura del cilindro extractor (308,15; 313,15 y 318, 15 K) se reguló utilizando un baño isotérmico de agua con una resistencia eléctrica y se aseguró temperatura uniforme con burbujeo de aire. El sistema permaneció operando de forma estática durante el tiempo a evaluar (40 a 140 min, según la etapa). Una vez transcurrido este tiempo, el sistema se descomprimió y el extracto se almacenó en 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. Finalmente, el extracto se colectó en viales de vidrio color ámbar de 125 cm<sup>3</sup>, bajo condiciones de oscuridad y a 276,15 K. La presión de experimentación se midió utilizando un manómetro Bourdon (Ritherm, modelo EN837-1, diámetro interno de 6 cm, escala de 0 a 700 bar, con subdivisiones de 10 bar), y la temperatura se midió con una termocupla tipo K acoplada a un termómetro digital (Hanna, modelo Hi 935005). La desviación promedio en las condiciones de presión fue de  $\pm 0,5$  MPa y de  $\pm 0,2$  K para la temperatura.



**Figura 2.** Montaje de la unidad de fluidos supercríticos

## 2.5. ETAPA IV: CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y FUNCIONAL DE LOS EXTRACTOS COLECTADOS

La CFT y CCT se evaluaron con el fin de obtener mayor información de sus perfiles de composición. Asimismo, se determinó la capacidad antioxidante del extracto con mayor CPT a través del método ORAC hidrofílico. A continuación se describe brevemente cada uno de los procedimientos implementados.

2.5.1. Preservación y almacenamiento de los extractos: Los extractos se concentraron por evaporación al vacío a 323,15 K y 0,008 MPa, siguiendo el procedimiento descrito por [Cerón \(2013\)](#). Las trazas de humedad se eliminaron 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) y los extractos se almacenaron en viales de vidrio, con atmósfera de nitrógeno, sello de presión y a 278,15 K hasta su posterior análisis.

2.5.2. Determinación del rendimiento de extracción: El rendimiento se determinó por gravimetría, comparando el peso del extracto liofilizado respecto a la masa seca cargada en cada experimento ([Martínez et al., 2009](#)) a través de la ecuación (1).

$$\% Rend = \left( m_{\text{extracto liofilizado}} / m_{\text{cáscara de cacao cargada}} \right) * 100 \quad (1)$$

Los resultados se expresaron en forma porcentual como gramo de extracto liofilizado por gramo de harina de cáscara de cacao en base seca (g EL/ g ms).

2.5.3. Determinación del contenido de polifenoles totales (CPT): El CPT presente en los extractos se determinó siguiendo el procedimiento descrito por [Wollgast \(2000\)](#). En un análisis regular, 50 µl del extracto a valorar fueron mezclados con 1,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (10 % v/v), e incubados por 5 min bajo condiciones de oscuridad. Luego se agregaron 1,5 ml de una solución de carbonato de sodio (7,5 % p/v) y la mezcla final se dejó en reposo durante 60 minutos. La absorbancia de las muestras se midió a 765 nm, usando agua destilada como blanco. Finalmente, el CPT se determinó a través de una curva de calibración construida con ácido gálico

como estándar (ver anexo D (a)), y los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto liofilizado (*mg EAG/g EL*).

2.5.4. Determinación del contenido de flavan-3-oles totales (CFT): El CFT se determinó utilizando el ensayo vainillina-HCl descrito por [Nakamura et al., \(2003\)](#). Brevemente, 500 µl del extracto a valorar se mezclaron con 1250 µl de vainillina (1% p/v, preparada diariamente en metanol) y 1250 µl de HCl 9 M en metanol. La mezcla se incubó durante 20 min a 303,15 K y bajo condiciones de oscuridad. Para cada caso se prepararon dos blancos: *i*) reemplazando el volumen de muestra por vainillina (1% p/v), y *ii*) reemplazando la solución de vainillina por metanol. La absorbancia final se determinó a 500 nm restando la absorbancia de los dos blancos. El CFT se calculó a partir de una curva de calibración construida con (-)-epicatequina como estándar (ver anexo D (b)). Los resultados fueron expresados en miligramos equivalentes de epicatequina por gramo de extracto liofilizado (*mg EP/g EL*).

2.5.5. Determinación del contenido de carotenoides totales (CCT): El CCT de los extractos se cuantificó siguiendo la metodología sugerida por [Rodríguez Amaya \(2006\)](#). La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 450 nm, usando etanol como blanco. La cuantificación se realizó a través de una curva de calibración con β-caroteno como estándar (ver anexo D (c)). Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de β-caroteno por gramo de extracto liofilizado (*mg EBC/g EL*).

2.5.6. Determinación de la capacidad antioxidante: La capacidad antioxidante se evaluó con el ensayo ORAC hidrofílico, usando la metodología propuesta por [Huang et al. \(2002\)](#). En un análisis típico, 150 µl de fluoresceína (FL) y 25 µl de la solución a valorar (extracto, estándar o blanco) se dispusieron en los pozos de una microplaca oscura de 96 lugares. La microplaca se incubó a 310,15 K durante 10 min y posteriormente, a cada pozo se le adicionaron 25 µL del iniciador de radicales libres AAPH. La señal de fluorescencia se evaluó por 1 h en intervalos de 1 min, bajo

longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 530 nm, respectivamente. La cuantificación se realizó utilizando una curva de calibración con Trolox como estándar (ver anexo D (d)). Los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de equivalentes de Trolox por gramo de extracto liofilizado ( $\mu\text{mol ET/g EL}$ ).

## 2.6. ETAPA V: CORRELACIÓN MATEMÁTICA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Con el fin de describir matemáticamente el proceso de extracción supercrítica para la cáscara de cacao, se planteó un modelo genérico en términos de cada familia de compuestos (polifenoles, flavan-3-oles y carotenoides totales) y del rendimiento. Las variables dependientes (CPT, CFT, CCT y % Rend) e independientes (T, P) y concentración másica de etanol (X) fueron correlacionadas por regresión múltiple implementando el uso de la teoría matricial (Miller & Freud, 1986). Para todos los casos, se consideró tanto la interacción lineal como cuadrática de las variables independientes (T, P, X, T\*P, P\*X, T\*X, P<sup>2</sup>, T<sup>2</sup>, X<sup>2</sup>). El algoritmo de cálculo se programó en MATLAB® R2009b y el grado de ajuste de los modelos matemáticos propuestos, se evaluó calculando la desviación relativa absoluta promedio (AARD), expresada en la ecuación (2):

$$AARD (\%) = \frac{100}{n} \sum \left( \frac{c_{experimental} - c_{calculado}}{c_{experimental}} \right) \quad (2)$$

donde  $n$  es el número de datos,  $c_{experimental}$  corresponde al valor experimental y  $c_{calculado}$  al valor estimado con el modelo.

## 2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La influencia del tiempo de extracción, tamaño de partícula, temperatura, presión y concentración másica de etanol se evaluó a través del análisis de varianza ANOVA. Los gráficos de efectos principales, los diagramas de Pareto, las pruebas de Tukey HSD y demás análisis estadísticos se realizaron utilizando Statistica7, desarrollado

por StatSoft Inc., en versión de prueba para Windows 7. Las superficies de respuesta se simularon usando Matlab® R2009b, desarrollado por MathWorks®.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. CARACTERIZACIÓN DE LA CÁSCARA DE CACAO

En la **Tabla 1** se resumen los componentes cuantificados para la cáscara de cacao, clon CCN-51. Los valores obtenidos de humedad, grasa, proteína, ceniza, fibra y carbohidratos guardan similitud con los reportados por [Vriesmann et al. \(2011\)](#), quienes caracterizaron la cáscara de un clon brasilero.

**Tabla 1.** Composición de la cáscara de cacao (clon CCN-51)

<b>Componente</b>	<b>Contenido (g/100 g ms) *</b>
Humedad	4,6 ± 0,30
Grasa	0,25 ± 0,01
Proteína	6 ± 0,05
Ceniza	7,8 ± 0,01
Fibra	28 ± 0,10
Carbohidratos	81 ± 0,28
Valor calórico (kcal/100 g)	351,97

<b>Componente</b>	<b>Contenido (mg/g ms) *</b>
CPT (mg EAG/ g ms)	32,8 ± 1,332
CFT (mg EEP/ g ms)	21,4 ± 0,598
CCT (mg EBC/ g ms)	0,077 ± 0,005

\* Los resultados están expresados en términos del promedio y la desviación estándar para n=2

Con relación al contenido de polifenoles totales (CPT), el valor determinado en este trabajo es 1,64 veces mayor que el reportado en Ecuador por [Martínez et al. \(2012\)](#) y 1,22 veces menor que el cuantificado por [Vriesmann et al. \(2011\)](#) en cáscaras de clones cultivados en Brasil. Aunque en la literatura no se encontraron precedentes con los cuales establecer una comparación del contenido de flavan-3-oles (CFT) y carotenoides totales (CCT), los valores presentados en la **Tabla 1** sugieren que por cada 60,000 g de cáscara de cacao cargados en el cilindro extractor se tienen disponibles aproximadamente 1,96 (±0,08) g, 1,28 (±0,04) g y 0,003 (±0,001) g de CPT, CFT y CCT, respectivamente.

Adicionalmente, los resultados obtenidos muestran que el CPT de la cáscara de esta variedad de cacao (clon CCN-51) puede llegar a ser 3,52, 2,59 y 1,34 veces

mayor que el reportado para la cáscara de banana, aguacate y granadilla, respectivamente; y sólo 1,79 y 2,14 veces menor que el de la cáscara de guayaba y mango, respectivamente (Ayala-Zavala *et al.*, 2011). Lo anterior hace posible sugerir a este residuo agroindustrial como una fuente aprovechable de polifenoles con potencial antioxidante.

### 3.2. TAMAÑO DE PARTÍCULA Y TIEMPO DE EXTRACCIÓN FAVORABLES PARA LA OBTENCIÓN DE POLIFENOLES TOTALES A PARTIR DE CÁSCARA DE CACAO

Con el fin de implementar la metodología de superficie de respuesta (MSR) y determinar el tamaño de partícula (Tp) y tiempo de extracción (t<sub>ext</sub>) favorables para la obtención de extractos ricos en polifenoles, los datos experimentales fueron ajustados a la expresión de segundo orden presentada en la ecuación (3).

$$CPT = \alpha_0 + \alpha_1 * t_{ext} + \alpha_2 * Tp + \alpha_3 * t_{ext}^2 + \alpha_4 * Tp^2 + \alpha_5 Tp * t_{ext} \quad (3)$$

En esta expresión se consideró la relación existente entre el CPT y el efecto lineal y cuadrático de las dos variables independientes (Tp y t<sub>ext</sub>). Con fines de comparación en la **Tabla 2** se resumen los coeficientes de regresión estimados.

**Tabla 2.** Coeficientes de regresión estimados desde un modelo de segundo orden

Factor	Coeficiente	Valor t	Valor-p	
<b>Intercepto</b>	$\alpha_0$	7,85873	5,18221	0,000176*
<b>t<sub>ext</sub></b>	$\alpha_1$	0,14934	6,69718	0,000015*
<b>Tp</b>	$\alpha_2$	3,59479	1,37832	0,191365
<b>t<sub>ext</sub>*t<sub>ext</sub></b>	$\alpha_3$	-0,00054	-6,18506	0,000033*
<b>Tp*Tp</b>	$\alpha_4$	-2,19857	-1,91133	0,078260**
<b>Tp*t<sub>ext</sub></b>	$\alpha_5$	0,00859	1,24262	0,235957
<b>Falta de ajuste</b>				0,127206
<b>R<sup>2</sup></b>	0,82			

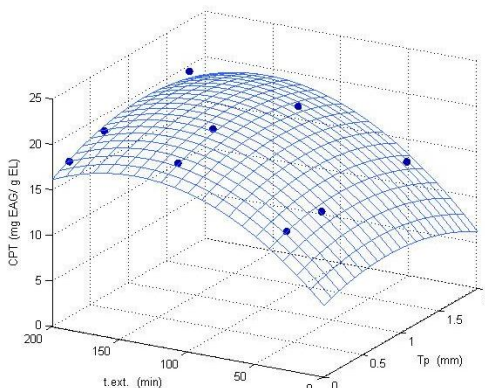
\* Coeficientes con significancia (valor-p<0,05) \*\* Coeficientes con probabilidad de significancia (valor-p<0,1)

En este contexto es bien sabido que tanto el tiempo de extracción como el tamaño y la morfología del material sólido tienen un efecto directo sobre la cantidad de extracto recuperado (Martínez, 2007). Sin embargo, al comparar el valor-p de cada coeficiente es posible notar que únicamente los relacionados con el tiempo de

extracción y su contribución cuadrática ( $\alpha_1$  y  $\alpha_3$ ) tienen efectos significativos (valor- $p < 0,05$ ). Asimismo, es de resaltar que de los coeficientes asociados con el tamaño de partícula ( $\alpha_2$  y  $\alpha_4$ ), sólo aquel que acompaña su contribución cuadrática ( $\alpha_4$ ) mostró poseer una leve probabilidad de significancia (valor- $p < 0,10$ ). Bajo estas observaciones, la función se simplificó hasta obtener la ecuación (4):

$$\text{CPT} = 7,85873 + 0,14934 * t_{\text{ext}} - 0,00054 * t_{\text{ext}}^2 - 2,19857 * T_p^2 \quad (4)$$

La anterior expresión explicó el comportamiento de los datos experimentales en un 80,35 % (valor- $p = 0,1994 > 0,05$  para la falta de ajuste, MS del error puro = 1,5795; en el anexo E se presentan los resultados para el tamaño de partícula y tiempo de extracción), permitiendo obtener la representación gráfica mostrada en la **Figura 3**. Adicionalmente, al determinar sus valores críticos fue posible inferir que tamaños de partícula menores a 1,11 mm y tiempos de extracción superiores a 147,12 min podrían favorecer la obtención de un mayor CPT bajo las condiciones de experimentación evaluadas en este trabajo.



**Figura 3.** Superficie de respuesta para el contenido de polifenoles totales en función del tamaño de partícula y tiempo de extracción

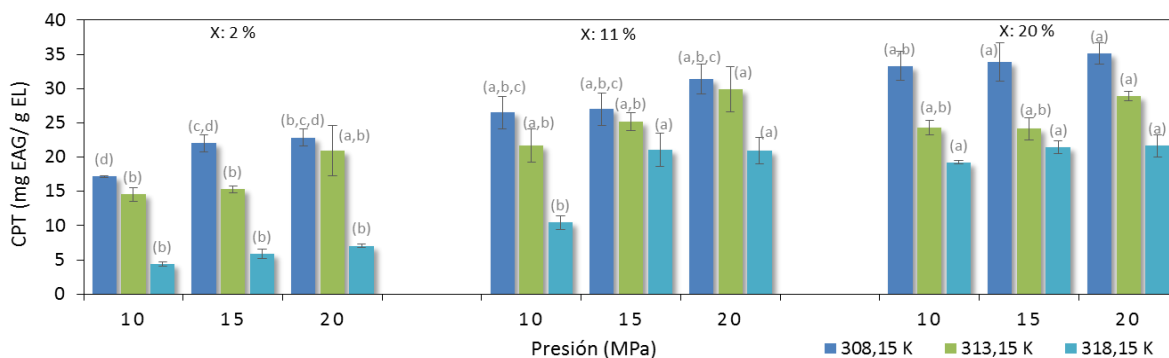
Es de resaltar que al analizar la significancia de los tres niveles evaluados para el tamaño de partícula, la prueba de Tukey HSD (presentada en el anexo F) mostró la ausencia de diferencias significativas (valor  $p < 0,05$ ) para 120 y 200 min de extracción. Por lo tanto, el anterior análisis reconfirmó que cualquier tamaño de partícula menor a 1,1050 mm podría favorecer la obtención de polifenoles totales a partir de cáscara de cacao (clon CCN-51). Finalmente, estos resultados se contrastaron con los reportados en la literatura para otras matrices orgánicas,

encontrando que no sólo son congruentes sino que además, existe una fuerte tendencia a trabajar tamaños de partícula cercanos a 0,25 mm (Reverchon, 1996; del Valle & Uquiche, 2002; Rahimi *et al.*, 2011).

Bajo los argumentos expuestos en los párrafos anteriores, el tamaño de partícula promedio y el tiempo de extracción de la siguiente etapa de este trabajo (Ver sección 3.3) se fijaron en 0,26 mm (Anexo C) y 140 min, respectivamente. Estos valores se consideraron como suficientes para garantizar la adecuada saturación de la fase fluida (CO<sub>2</sub>-sc + etanol) y favorecer la obtención de extractos ricos en compuestos polifenólicos a partir de cáscara de cacao.

### 3.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA, PRESIÓN Y CONCENTRACIÓN MÁSCICA DE ETANOL EN LOS PERFILES DE COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS

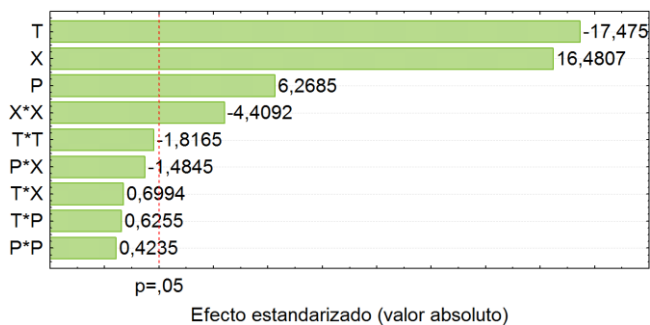
En la **Figura 4** se presentan las isothermas de extracción de polifenoles totales (a 308,15; 313,15 y 318,15 K) en función de la presión (P) y composición másica de etanol (X). El CPT reportado corresponde al promedio de al menos 4 mediciones, y las barras de error indican la variación obtenida en cada caso. Según la prueba de Tukey, los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los valores medios determinados para cada isoterma.



**Figura 4.** Variación del contenido de polifenoles totales extraídos en función de la temperatura, presión y concentración másica de etanol.

En las condiciones de experimentación evaluadas, los tres factores independientes (T, P y X) generan efectos significativos sobre el CPT extraído

(valor- $p < 0,05$ ). Lo anterior puede confirmarse gráficamente a través del diagrama de Pareto presentado en la **Figura 5** (y en el análisis de varianza ANOVA resumido en el Anexo H). Esta representación gráfica sugiere que la temperatura no sólo es el factor más influyente, sino que a la vez logra generar una disminución del CPT. Asimismo se puede observar que tanto la presión como la concentración másica de etanol (contribución lineal y cuadrática) son variables capaces de producir aumentos en el CPT.

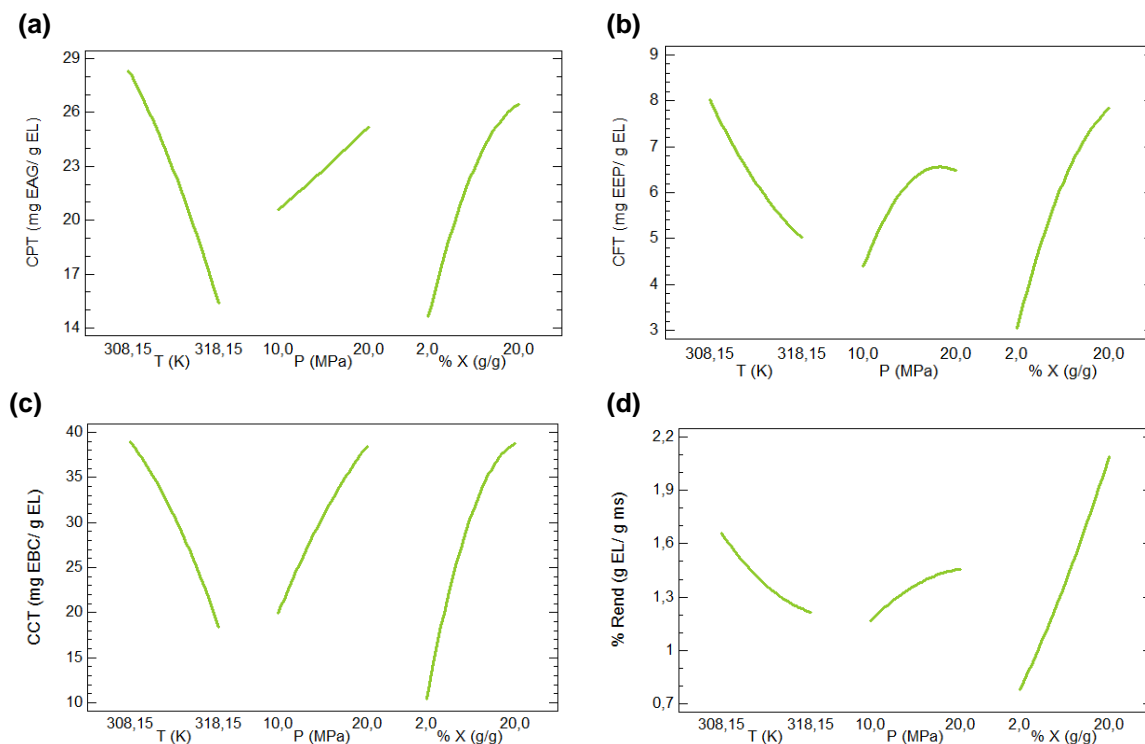


**Figura 5.** Diagrama de Pareto para el contenido de polifenoles totales

Con fines de comparación, en la **Figura 6** se presentan los gráficos de efectos principales tanto para el CPT, como para el CFT, CCT y rendimientos determinados al variar la temperatura, presión y concentración másica de etanol (las tablas de varianza ANOVA y los diagramas de Pareto para las últimas tres variables de respuesta se encuentran consignados en los anexos H e I respectivamente). Como puede observarse, los perfiles descritos en la **Figura 6(a)** manifiestan una notable disminución (~48,28 %) del CPT al aumentar la temperatura. Igualmente puede percibirse que los aumentos en la concentración másica de etanol generan mayores incrementos en el CPT que los originados por la presión.

Un análisis general de las **Figura 6 (a) (b), (c) y (d)** deja en evidencia que las tendencias anteriormente descritas se conservan para el CFT, CCT y el rendimiento másico de la operación de extracción. No obstante, es posible notar que para todos los casos, los cambios más acentuados se producen al disminuir la temperatura y al incrementar la concentración másica de etanol, observándose

aumentos de hasta 53,84; 37,5; 25,0 y 31,8 % para el CPT, CFT, CCT y rendimiento, respectivamente.



**Figura 6.** Gráficos de efectos principales para el contenido de polifenoles (CPT) **(a)**, flavan-3-oles (CFT) **(b)** y carotenoides (CCT) **(c)** totales, y rendimiento (% Rend) **(d)**

Con el fin de analizar en conjunto la correlación existente entre las variables dependientes (% Rend, CPT, CFT y CCT) e independientes (T, P, X) involucradas en este proceso de extracción, se construyó una matriz de comparación utilizando los coeficientes de correlación de Pearson ( $r$ ), los cuales se encuentran resumidos en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Coeficientes de correlación de Pearson

	% Rend	CPT	CFT	CCT
T	-0,2090 <sub>(a)</sub>	-0,6580 <sub>(b)</sub>	-0,4160 <sub>(c)</sub>	-0,4405 <sub>(d)</sub>
P	0,2132 <sub>(a)</sub>	0,2432 <sub>(b)</sub>	0,3516 <sub>(c)</sub>	0,4785 <sub>(d)</sub>
X	0,9271 <sub>(a)</sub>	0,6130 <sub>(b)</sub>	0,7034 <sub>(c)</sub>	0,6736 <sub>(d)</sub>

\*Para cada fila, los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas (valor-p <0,05)

Como era de esperarse, la temperatura presentó un grado de asociación negativo con todas las variables dependientes. Sin embargo, su efecto mostró ser más acentuado sobre el CPT ( $r=-0,6580$ ). Por el contrario, los grados de asociación de la presión y la concentración másica de etanol fueron positivos para todos los casos. El mayor grado de correlación de la presión corresponde al alcanzado con el CCT ( $r=0,4785$ ). Igualmente, es de resaltar que la concentración másica de etanol mostró poseer un alto grado de asociación con las 4 variables dependientes, particularmente con el porcentaje de rendimiento ( $r=0,9271$ ). Las tendencias descritas anteriormente son congruentes con las observadas en los trabajos de [Andrade \*et al.\*, \(2012\)](#), [Ekinci & Gürü \(2014\)](#) y [Espinosa-Pardo \*et al.\*, \(2014\)](#), quienes realizaron extracciones supercríticas a partir de cascarilla de café, semillas de durazno y pulpa de chontaduro, respectivamente.

Asimismo, estos resultados al ser analizados sugieren que en promedio un 26,86% de polifenoles totales son flavan-3-oles. Con relación al CCT, cabe mencionar que en promedio su valor fue 1,25 veces mayor que el CPT. Sin embargo, pese a su polaridad opuesta, estas dos familias de compuestos presentaron tendencias muy similares al variar la temperatura, presión y relación másica de etanol durante la extracción (ver **Figura 6**). Lo anterior puede tomarse como un indicativo de la ausencia de efectos competitivos o antagónicos que limitaran la extracción de una u otro de estas familias de componentes ([de Melo \*et al.\*, 2014](#); [Dobbs & Johnston, 1987](#)).

En general, los resultados obtenidos en este trabajo son particularmente interesantes porque dejan al descubierto que pese a la existencia de un modificador de polaridad (en este caso etanol), la contribución apolar del CO<sub>2</sub>-sc también tiende a manifestarse sobre el poder de solvatación de la fase fluida. De esta manera se sugiere que esta técnica de extracción permite obtener extractos ricos en compuestos tanto polares (polifenoles y flavan-3-oles) como apolares (carotenoides) a partir de cáscara de cacao.

Es de resaltar que en el intervalo estudiado en este trabajo, las condiciones más favorables para la obtención de extractos ricos en polifenoles correspondieron a

308,15 K, 20 MPa y 20 % de etanol, bajo las cuales el CPT fue de 35,11 ( $\pm 1,57$ ) mg EAG/ g EL. Asimismo, para estas condiciones los extractos mostraron poseer un CFT y CCT de 12,89 ( $\pm 0,51$ ) mg EEP/ g EL y 64,35 ( $\pm 1,54$ ) mg EBC/ g EL, respectivamente. Finalmente, el CPT máximo de este trabajo guarda una gran similitud con el reportado por [Andrade et al. \(2012\)](#), quienes obtuvieron 36 ( $\pm 1$ ) mg EAG/ g EL a partir de cascarilla de café, trabajando a 323,14 K, 20 MPa y 8 % de etanol (todos los valores se presentan en el anexo G).

Con relación a los rendimientos de este proceso, cabe mencionar que el valor máximo alcanzado (2,3 %) se encuentra dentro del orden de magnitud determinado para varios residuos agroindustriales. Si bien, la literatura reporta estudios con rendimientos levemente superiores e inferiores, estas diferencias pueden atribuirse a la estructura lignocelulósica de cada una de las matrices de trabajo ([Bruner, 1994](#)). Para efectos de comparación, en la **Tabla 4** se presentan los rendimientos obtenidos en 4 estudios similares.

**Tabla 4.** Comparación del porcentaje de rendimiento obtenido a partir de diferentes matrices

Matriz	Condiciones de experimentación	% Rend * (g E/g ms)	Referencia
<i>Theobroma cacao</i> L. (cáscara de cacao)	308,15 K, 20 MPa y 20 % de etanol	2,3 <sub>(c)</sub>	Este trabajo
<i>Coffea canephora</i> (cascarilla de café)	323,14 K, 20 MPa y 8 % de etanol	2,2 <sub>(c, d)</sub>	<a href="#">Andrade et al, 2012</a>
<i>Persea gratissima</i> (bagazo de aguacate)	333 K, 30,4 MPa y 0 % de etanol	6,8 <sub>(a)</sub>	<a href="#">Döker et al., 2004</a>
<i>Mangifera indica</i> L. (cáscara de mango)	323,15 K, 30 MPa y 0 % de etanol	1,7 <sub>(d)</sub>	<a href="#">García &amp; Potosí, 2012</a>
<i>Bactris gasipaes</i> (pulpa de chontaduro)	313,15 K, 30 MPa y 0 % de etanol	4,1 <sub>(b)</sub>	<a href="#">Espinosa-Pardo et al., 2014</a>

\*No existen diferencias significativas (valor-p <0,05) entre los valores con la misma letra

#### 3.4. CORRELACIÓN MATEMÁTICA DE LAS VARIABLES IMPLICADAS EN LA EXTRACCIÓN SUPERCRÍTICA

En la **Tabla 5** se presentan los parámetros y AARD (%) de los modelos propuestos para describir el comportamiento de cada una de las variables

dependientes (CPT, CFT, CCT y rendimiento) involucradas en la extracción supercrítica de cáscara de cacao, clon CCN-51.

**Tabla 5** Parámetros y AARD de los modelos empíricos

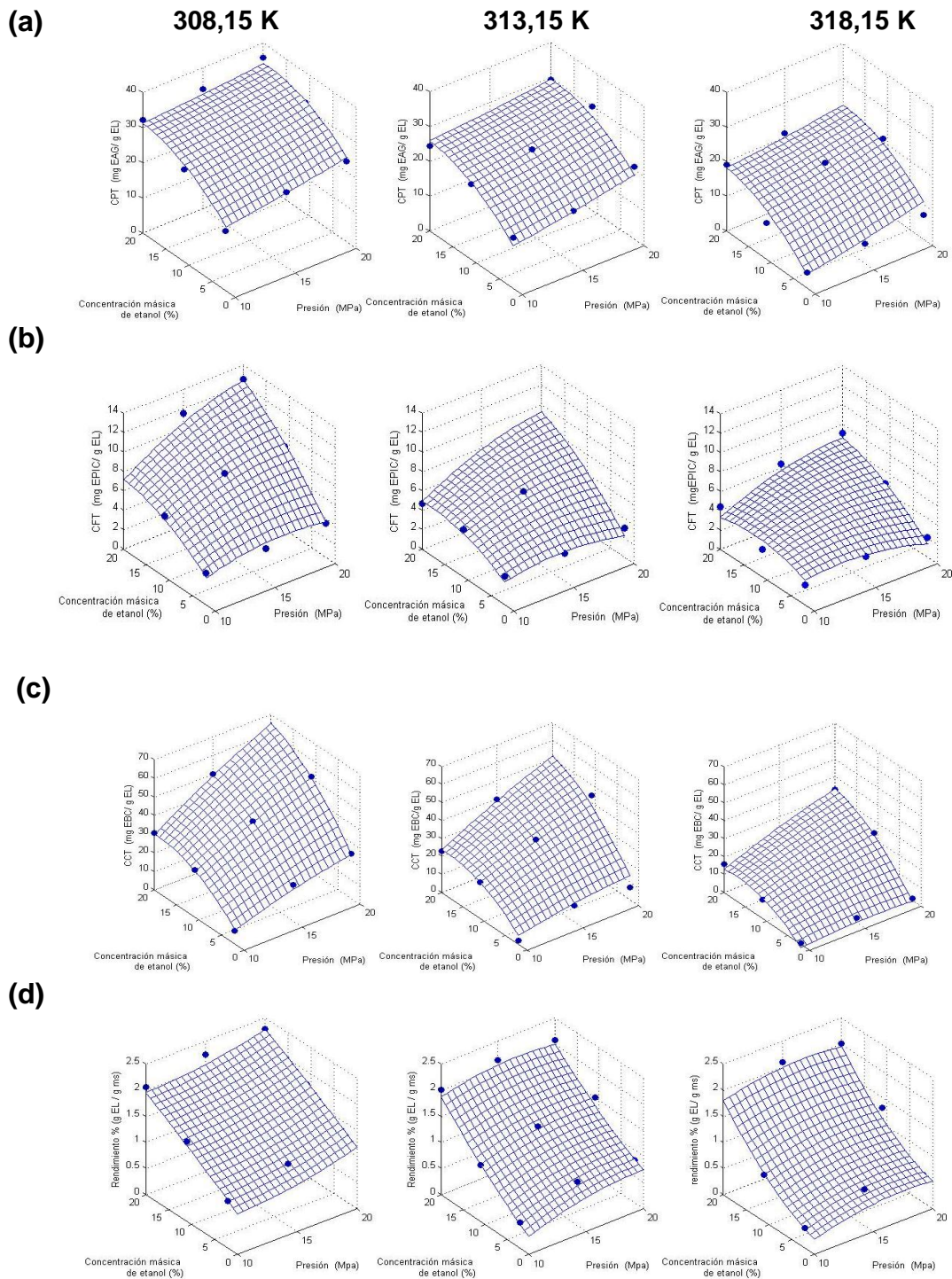
	Variable Dependiente= $\beta_0 + \beta_1 T_{ext} + \beta_2 P + \beta_3 X + \beta_4 T_{ext} P + \beta_5 P X + \beta_6 T_{ext} X + \beta_7 P^2 + \beta_8 T_{ext}^2 + \beta_9 X^2$										AARD (%)
	Parámetro										
	$\beta_0$	$\beta_1$	$\beta_2$	$\beta_3$	$\beta_4$	$\beta_5$	$\beta_6$	$\beta_7$	$\beta_8$	$\beta_9$	
CPT	-4065,001	27,557	-3,338	-0,489	0,0118	-0,0154	0,0070	0,0106	-0,0465	-0,0359	9,39%
CFT	1196,181	-7,876	7,022	6,4309	-0,0197	0,0251	-0,0202	-0,0304	0,0129	-0,0102	12,20%
CCT	-8262,105	52,056	48,284	14,811	-0,1467	0,1065	-0,0423	-0,0556	-0,0822	-0,0727	10,33%
Rend.	184,878	-1,128	0,279	-0,603	-0,0005	-0,0006	0,0021	-0,0035	0,0017	0,0014	5,36%

La comparación general de los valores de AARD permite inferir que los modelos propuestos logran describir la tendencia global de los datos experimentales. Para efectos de comparación, en la **Figura 7** se muestran las superficies isotérmicas generadas para cada familia de compuestos y para el rendimiento.

### 3.5. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS

El valor ORAC obtenido para el extracto de cáscara de cacao (clon CCN-51) con mayor CPT fue de 490 ( $\pm 54$ )  $\mu\text{mol ET/ g EL}$ . Este valor es 1,09 y 3,65 veces superior que el reportado por [Mejía \(2014\)](#) y [Costa et al. \(2012\)](#) para extractos supercríticos de flores de Jamaica ( $450 \pm 16 \mu\text{mol ET/ g EL}$ ) y hojas de lavanda verde ( $134,06 \pm 13,69 \mu\text{mol ET/ g EL}$ ).

Finalmente, es de resaltar que este valor es sólo 1,38 y 1,09 veces menor que el reportado por [Arias \(2012\)](#) para antioxidantes comerciales sintéticos como el BHT ( $678 \pm 10 \mu\text{mol ET/ g BHT}$ ) y la vitamina-E ( $536 \pm 8 \mu\text{mol ET/ g vitamina-E}$ ), respectivamente. Estos resultados sugieren que la cáscara de cacao (clon CCN-51) es una fuente potencial para la extracción de compuestos antioxidantes y de alto valor agregado usando  $\text{CO}_2\text{-sc}$  y etanol como solventes.



**Figura 7** Superficies isotérmicas para CPT (a), CFT (b), CCT (c) y % Rend (d). Los puntos hacen referencia a los valores experimentales y las mallas a las superficies generadas con los modelos propuestos. Por el ángulo de captura de las imágenes es posible que algunos puntos se encuentren ocultos.

#### 4. CONCLUSIONES

Al evaluar el tamaño de partícula y el tiempo de extracción sobre el contenido de polifenoles totales (CPT), se evidenció que sólo este último y su contribución cuadrática logran generar efectos significativos (valor- $p < 0,05$ ). En este sentido, tiempos de extracción superiores a 147,18 min mostraron favorecer la obtención de un mayor contenido de polifenoles totales (CPT) a partir de cáscara de cacao usando como solventes  $\text{CO}_2\text{-sc}$  + etanol.

En las condiciones de temperatura (T: 308,15; 313,15 y 318,15 K), presión (P: 10, 15 y 20 MPa) y concentración másica de etanol (X: 2, 11 y 20 %) evaluadas, se evidenció que el contenido de polifenoles totales extraído aumenta en un 53,84 % ante los incrementos de presión y concentración másica de etanol. Por el contrario, los incrementos en la temperatura generaron una disminución de hasta un 48,28 %. Una tendencia similar fue observada tanto en la variación del contenido de flavan-3-oles como en el de carotenoides totales.

La extracción supercrítica de polifenoles, flavan-3-oles y carotenoides totales fue descrita a través de modelos que consideraron el efecto lineal, cuadrático y la interacción entre la temperatura, presión y concentración másica de etanol con AARD menores a 12,20 %.

La capacidad antioxidante de los extractos de cáscara de cacao (clon CCN-51) fue comparable con los valores ORAC reportados para antioxidantes sintéticos como el BHT y vitamina-E.

## 5. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

Bajo el concepto de biorefinería y con miras a formular un mayor aprovechamiento de la cáscara de cacao, se sugiere la implementación de procesos posteriores a la extracción supercrítica que visen a la recuperación de los metabolitos restantes (lípidos, carbohidratos, pectinas,...).

Si bien, los resultados obtenidos mediante el ensayo ORAC hidrofílico revelan una considerable capacidad antioxidante en los extractos de cáscara de cacao (clon CCN-51), se recomienda evaluar su respuesta a otras técnicas tales como ORAC lipofílico, DPPH (1,1-difenil-1-picrilhidrazilo) y ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) estos como iniciadores de radicales libres.

Se recomienda realizar un estudio de la mezcla CO<sub>2</sub>-sc y etanol para determinar la influencia del cosolvente sobre las condiciones críticas.

## BIBLIOGRAFÍA

ALZAMORA, S. M., GUERRERO, S. M., NIETO, A. B. VIDALES, S. L. (2004). *Conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas: Manual de capacitación*. Corporativo: FAO, Roma (Italia).

ARAUS, K., CANALES, R., ROBERT, P., DEL VALLE, J., & DE LA FUENTE, J. (2010). *Solubility of Nutraceutical Carotenoid Compounds in Pure Supercritical CO<sub>2</sub> and Modified with Triolein or Ethanol*. *Journal of Biotechnology* 150. Pp 531-532.

AZMIR, J., ZAIDU, L. I., RAHMAN, M., SHARIF, K., MOHAMED, A., SAHENA, F. (2013). *Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review*. *Journal of Food Engineering* 117.4. Pp 426-4336.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., & SAMMAN, S. (2006). *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. *Food Chemistry* 99. Pp 191-203.

BARTLE, K., CLIFFORD, A., JAFAR, S., & SHILSTONE, G. (1991). *Solubilities of Solids and Liquids of Low Volatility in Supercritical Carbon Dioxide*. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* 20. Pp 1-8.

BERNA, A., CHAFER, A., J.B, M., & SUBIRATS, S. (2000). *High-pressure solubility data of system ethanol (1) +catechin (2) + CO<sub>2</sub> (3)*. *Journal of Supercritical Fluids* 20. Pp 157-162.

BONVEHÍ, J. S., & BENERÍA, M. A. (1998). *Composition of dietary fibre in cocoa husk*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A* 207. Pp 105-109.

BRIGNOLE, E., SKJOLD-JORGENSEN, S., & FREDENSLUND, A. (1984). *Application of a Local Composition Equation of State to Supercritical Fluid Phase Equilibrium Problems*. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 88 . Pp 801-806.

BRUNNER, Gerd. H. (2005). *Supercritical fluids: technology and application to food processing*. *Journal of Food Engineering* 67. Pp 21-33.

CADENA, Tatiana., HERRERA, Yenny. (2008). "*Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su capacidad antioxidante*". Director: Luis Javier López Giraldo Ph.D. Universidad Industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química, Colombia.

CALERO, Cesar. (2012). "*Nuevas expresiones semiempíricas para el modelamiento de solubilidades de polifenoles en dióxido de carbono supercrítico y etanol*". Director: Luis Javier López Giraldo Ph.D. Universidad Industrial de Santander, Escuela de Ingeniería Química, Colombia.

CASTELLANO, Oscar. FONSECA, Luz M. MONTAÑEZ, Sandra., & SÁNCHEZ, Adriana. (2007). "*Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de cacao-chocolate en Colombia*". Universidad Nacional de Colombia, Colombia:

CHÁFER, A., BERNA, A., MONTÓN, J., & MUÑOZ, R. (2002). *High-pressure solubility data of system ethanol (1) + epicatechin (2) + CO<sub>2</sub> (3)*. *The Journal of Supercritical Fluids* 24. Pp 103-109.

CHAFER, A., FORNARIB, T., BERNA, A., IBAÑEZ, E., & REGLERO, G. (2004). *Solubility of solid carnosic acid in supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol as a co-solvent*. *The Journal of Supercritical Fluids* 34. Pp 323–329.

COSTA, P. GROSSO, C. GONÇALVES, S. ANDRADE, P. VALENTÃO, P. GABRIELA BERNARDO-GIL, M. & ROMANO, A. (2012). *Supercritical fluid extraction and hydrodistillation for the recovery of bioactive compounds from Lavandula viridis L'Hér.* Food Chemistry 135. Pp 112-121.

DE MELO, M., SILVESTRE, A., & SILVA, C. (2014). *Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology.* The Journal of Supercritical Fluids 92. Pp 115-176.

DEL VALLE, J., & AGUILERA, J. (1988). *An improved equation for predicting the solubility of vegetable oils in supercritical CO<sub>2</sub>.* Industrial & engineering chemistry research 27. Pp 1551-1553

RODRIGUEZ AMAYA, Delia B. (2001). *A Guide To Carotenoid Analysis In Foods.* Washington D.C: ILSI Press.

DÍAZ-REINOSO, R. M. (2006). *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction and purification of compounds with antioxidant activity.* Agricultural and Food Chemistry 54. Pp 2441-2469.

DOHRN, R. FONSECA, J. & PEPPER, S. (2012). *Experimental Methods for Phase Equilibria at High Pressures.* Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering 3. Pp 367- 434.

ESLAMIMANESH, A. GHARAGHEIZI, F. MOHAMMADI, A. & RICHON, D. (2009). *Artificial Neural Network modeling of solubility of supercritical carbon dioxide in 24 commonly used ionic liquids.* Chemical Engineering Science 66. Pp 3039-3044.

ESPINOSA-PARDO, F. MARTINEZ, J & MARTINEZ-CORREA, H. A. (2014). *Extraction of bioactive compounds from peach palm pulp (Bactris gasipaes) using supercritical CO<sub>2</sub>.* The Journal of Supercritical Fluids 93. 115-180.

GARCIA, MARIA DEL PILAR. CABRAL, F. MARTINEZ CORREA. (2013) *Supercritical CO<sub>2</sub> and pressurized solvent extraction processes for bioactive compounds from mango peel waste. (Mangifera indica L.)*. III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids. Cartagena de Indias (Colombia).

GUERRERO ERASO, C. A. (2009). "*Inhibición de la Actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (Cavendish valery) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico*". Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. Colombia

GUPTA, Ram. B. & SHIM, Jae. J. (2006). *Solubility in supercritical carbon dioxide*. Edición uno. Estados Unidos: CRC press.

HERRERO, M. M. MENDIOLA, J. A., CIFUENTES, A. & IBÁÑEZ, E. (2010). *Supercritical fluid extraction: recent advances and applications*. Journal of Chromatography 16. Pp 2495-2511.

HII, C. LAW, C. SUZANNAH, S. & CLOKE, M. A. (2009). *Polyphenols in cocoa (Theobroma cacao L.)*. Asian Journal of Food and Agro-Industry 2. Pp 702-722.

JAIMES, Y. ARANZAZU, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L.) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Colombia. Corpoica Produmedios.

JUN, J. WANG, Y. WU, H. LI, J. & ZHANG, Z. (2012). *Equilibrium solubilities of ammonium benzoate, benzamide and their mixture in supercritical carbon dioxide*. Fluid Phase Equilibria 334. Pp 152-156

JUNIOR, Mário Roberto. ALICE, Vieira Leite. ROMANELLI, Nathalia. DRAGANO, Vicente. (2010). *Supercritical fluid extraction and stabilization of phenolic*

*compounds from natural sources—review (supercritical extraction and stabilization of phenolic compounds)*. The Open Chemical Engineering Journal 4.Pp. 51-60.

KAMMERER, Dietmar, et al. (2014). *Recovery of polyphenols from the by-products of plant food processing and application as valuable food ingredients*. Food Research International. Pp.1-37.

KHA, Tuyen C. HUAN, Phan-Tai. MINH, Nguyen. (2014). *Effects of pre-treatments on the yield and carotenoid content of Gac oil using supercritical carbon dioxide extraction*. Journal of Food Engineering 120.Pp. 44-49.

KING, Jerry W. (2014). *Modern Supercritical Fluid Technology for Food Applications*. Annual review of food science and technology 5.Pp. 215-238.

LOPEZ-GIRALDO, Luis Javier. (2009). *Lipophilisation enzymatique de composés phénoliques et évaluation de leurs propriétés antioxydantes*. Oléagineux, Corps Gras, Lipides 16.Pp.273-275.

LIM T.K. (2012). *Theobroma cacao*. Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: and Fruits, 208. Springer ScienceBusiness Media B.V.

LÓPEZ, Roberto. ALEJANDRE, José. (2008). *Molecular Dynamics Simulations of the Solubility of H<sub>2</sub>S and CO<sub>2</sub> in Water*. Journal of the Mexican Chemical Society 52.Pp.88-92.

LUTHRIA, Devanand L. (2008). *Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley flakes using a pressurized liquid extractor*. Food Chemistry 107.Pp.745-752.

MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D. FERNANDEZ-SEVILLA, J. M. FERNÁNDEZ, F. G. GARCÍA, M. C. MOLINA-GRIMA, E. (2010). *Supercritical fluid extraction of carotenoids from Scenedesmus almeriensis*. Food chemistry 123.Pp. 928-935.

MARTÍNEZ-CORREAA, Hugo Alexander. CABRALA, Fernando Antonio.

MAGALHÃESC, Pedro Melillo. LOPES DE OLIVEIRAD, Alessandra. *Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction as Pretreatment On Low-Pressure Extractions: Global Extraction Yield.E*

MARTINEZ, Jose L. (2007). *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds 1*. U.S.A. :Taylor & Francis Group.

MÉNDEZ-SANTIAGO, Janette. TEJA, Aryn S. (1999). *The solubility of solids in supercritical fluids*. Fluid Phase Equilibria 158.Pp. 501-510.

MILLER, Irwin. FREUND, John E. (1973). *Probabilidad y estadística para ingenieros 1*. U.S.A.: Reverté.

MINATELLI, John A. HILL, W. Stephen. MOERCK, Rudi. NGUYEN Uy. (2014). *Chia seed composition*. U.S. Patent 8,652,544, issued February 18.

MONSALVE, L. GARCÍA, C. SIGARROA, A. (2005). *Obtención de embriones somáticos primarios de Theobroma cacao en clones de interés regional para el departamento Norte de Santander, Colombia*. Revista Respuestas 1.Pp. 21-28.

PEREIRA, Camila G. MEIRELES, M. Angela. (2010). *Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives*. Food and Bioprocess Technology 3.Pp. 340-372.

PEREA VILLAMIL, A. MARTÍNEZ GUERRERO, N. ARANZAZU HERNÁNDEZ, F.

CADENA CALA, T. (2013). *Características de Calidad del Cacao de Colombia. Catálogo de 26 Cultivares*. Bucaramanga: División de Publicaciones UIS.

PHAN, Huong TT. TSUYOSHI, Yoda. BINDU, Chahal. MASAMUNE, Morita. MASAHIRO, Takagi. MUN'DELANJI, Vestergaard. (2014). *Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1838. Pp.2670-2677.

PROEXPORT. (2012). Sector Agroindustrial Colombiano . *Sociedad de Agricultores de Colombia*, 1-16.

REIF, Constance. ARRIGONI, Eva. SCHÄRER, Hans. NYSTRÖM, Laura. HURRELL, Richard F. (2013). *Carotenoid database of commonly eaten Swiss vegetables and their estimated contribution to carotenoid intake*. *Journal of Food Composition and Analysis* 29.Pp.64-72.

REVERCHON, Ernesto, DE MARCO, Lolanda. (2006). *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter*. *The Journal of Supercritical Fluids* 38.Pp.146-166.

SÁNCHEZ-MORENO, Concepción. (2002). *Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems*. *Food Science and Technology International* 8.Pp.121-137.

SAJAB, Mohd Shaiful. CHIN, Hua Chia. SARANI, Zakaria. IRMAN, Abdul Rahman. MOHD. Sapuan. (2013). *Alkaline-treated cocoa pod husk as adsorbent for removing methylene blue from aqueous solutions*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1.Pp. 460-465.

SHARIF, K. M. RAHMAN, M. M. AZMIR, Jannatul. MOHAMED, A., JAHURUL, M. H. A. SAHENA, F. ZAIDUL, I. S. M. (2014). *Experimental design of supercritical fluid extraction–A review*. Journal of Food Engineering 124.Pp. 105-116.

ŠKERGET, Mojca, KNEZ, Željko. KNEZ-HRNČIČ, Maša. (2011). *Solubility of solids in sub-and supercritical fluids: a review*. Journal of Chemical & Engineering Data 56.Pp. 694-719.

SMITH, Roger M. (1999). *Supercritical fluids in separation science–the dreams, the reality and the future*. Journal of Chromatography 856.Pp. 83-115.

VRIESMANN, Lúcia Cristina, DIAS DE MELLO, Renata. OLIVEIRA-PETKOWICZ, Carmen Lúcia. (2011). *Cacao pod husks (Theobroma cacao) Composition and hot-water-soluble pectins*. Industrial Crops and Products 34.Pp. 1 1173-1181.

WANG, C. C. CHANG, S. C. INBARAJ, B. Stephen. CHEN, B. H. (2010). *Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from (Lycium barbarum) and evaluation of antioxidant activity*. Food Chemistry 120.Pp. 184-192.

WOLLGAST, Jan. ANKLAM, Elke. (2000). *Review on polyphenols in Theobroma cacao changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification*. Food Research International 33.Pp. 423-447.

XI, Jun, et al. (2009). *Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction*. International Journal of Pharmaceutics 382.Pp. 139-143.

YAN, Shuiping FANG, Mengxiang. ZHANG, Weifeng. LUO, Zhongyang. CEN, Kefa. (2006). *Technique analyses and research progress of CO<sub>2</sub> separation from flue*

gas by chemical absorption. *Chemical Industry and Engineering Progress* 25.Pp. 1018-1025.

ZHOU, Ming-liang. WANG, Hong-fei. HE, Yi-jun. (2008). *Study on Supercritical CO<sub>2</sub> Fluid Extraction Technology and Properties of Carya kernel Oil* . *Food Science* 2.Pp. 031.

.

## ANEXOS

### Anexo A. Estructura genérica de los polifenoles y flavan-3-oles

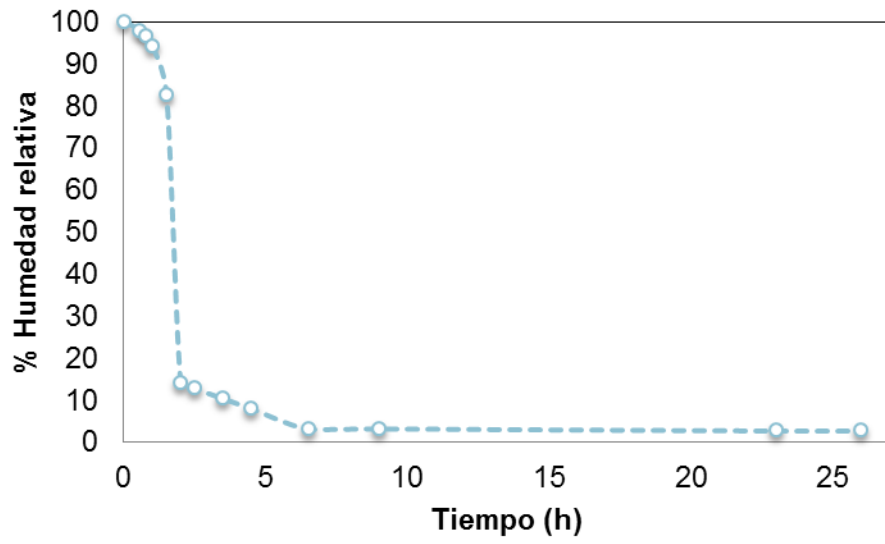
Estructuras genéricas de algunos polifenoles flavonoides*		
Flavonas	Flavanonas	
Flavonoles	Flavanoles	
Estructuras genéricas de algunos polifenoles no flavonoides**		
Ácido gálico	Ácido cinámico	Ácido protocateuico
Estructura genérica de los carotenoides***		

\*Adaptadas de: [López-Giraldo \(2008\)](#)

\*\*Adaptadas de: [Balasundram et al. \(2006\)](#)

\*\*\*Adaptada de: [Rodríguez-Amaya \(2001\)](#)

**Anexo B.** Curva de secado de la cáscara de cacao (Clon CCN-51)



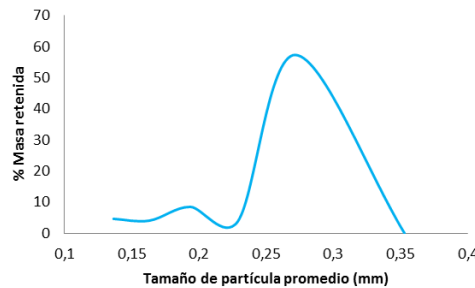
## Anexo C. Protocolos de caracterización de la cáscara de cacao (clon CCN-51)

### ❖ Determinación del tamaño de partícula

El diámetro de partícula promedio se determinó según el método ASAE (ASAE, 1997). Brevemente, una muestra de 175 g de harina de cáscara de cacao se acondicionó en un conjunto de tamices de la serie Tyler (desde el mesh 50 hasta el 100 (tamiz standard J. Bolaños, modelo A.S.T.M.E-1). Luego, los tamices se colocaron en un agitador magnético (Portable Sieve Shaker CE Tyler, modelo RX 24) durante 15 min. El peso de las fracciones colectadas en cada tamiz se determinó por gravimetría utilizando una balanza analítica (Ohaus®, modelo Pionner®). Finalmente, el diámetro de partícula promedio se estimó utilizando la **Ecuación (5)** y se obtuvo la distribución de pesos presentada a continuación:

$$d_{pp} = \log^{-1} \left( \frac{\sum_{i=1}^n (m_i * \log(\bar{d}_i))}{\sum_{i=1}^n (m_i)} \right) \quad (5)$$

donde:  $\bar{d}_i$  corresponde al diámetro geométrico promedio y se calcula como  $\bar{d}_i = \sqrt[2]{(d_i * d_{i+1})}$ ,  $d_i$  y  $d_{i+1}$  corresponden a los diámetros de abertura de los tamices y  $w_i$  hace referencia al peso del material retenido en cada tamiz.



Numero de tamiz	Peso del tamiz(g)	Peso Muestra (g)	di prom (mm)	% Masa retenida
50	383,97	0	0,352913783	0,000
60	380,80	6,72	0,271981701	3,840
70	383,97	14,83	0,229079275	8,473
80	379,22	7,04	0,193607324	4,022
100	371,22	8,06	0,163233293	4,605
Fondo	405,60	37,95	0,136570771	21,683

❖ Determinación del contenido de polifenoles totales y flavan-3-oles totales presentes en la cáscara de cacao

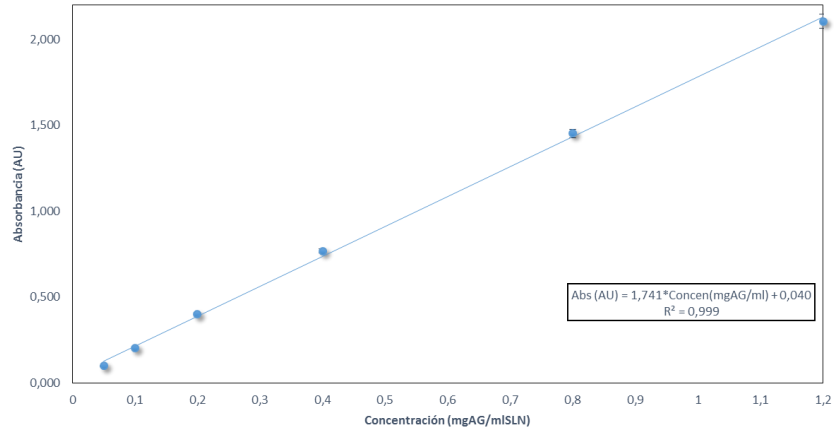
Con este fin se realizó una extracción sólido líquido (S-L) siguiendo el procedimiento descrito por [Cadena & Herrera \(2008\)](#). En un procedimiento regular, 1 g de cáscara se puso en contacto con 20 ml de una solución etanol: agua (80:20, v/v) en un balón de vidrio. El proceso de extracción se realizó a 333,15 K y agitación constante durante 15 min. Luego la muestra se transfirió a un tubo falcón y fue sometida a una separación de fases mediante centrifugación a 3500 rpm durante 15 min a 298,15 K. El sobrenadante se centrifugó y filtró. Los extractos obtenidos se almacenaron en un vial color ámbar y fueron rotulados y guardados en espacio refrigerado a 277,15 K hasta su uso. Finalmente, el contenido de polifenoles y flavan-3-oles totales se determinó como se expuso en la sección de metodología.

❖ Determinación del contenido de carotenoides totales presentes en la cáscara de cacao:

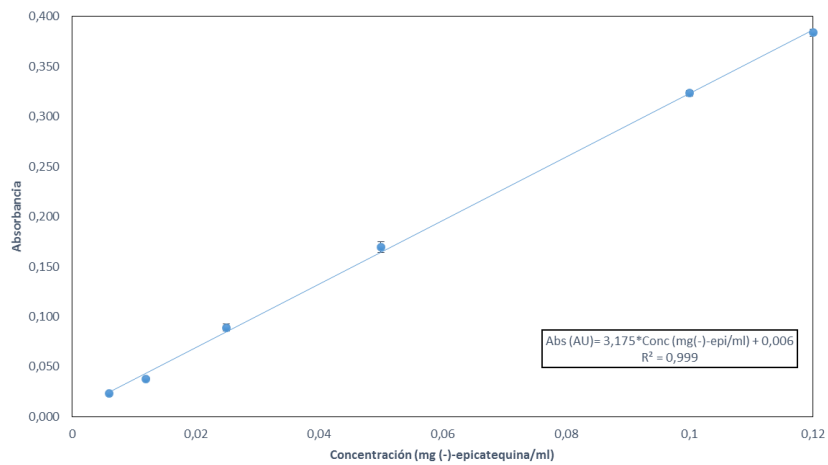
La extracción de carotenoides se realizó siguiendo la metodología descrita por [Wang et al., \(2010\)](#). En el cual una muestra de harina de cascara de cacao (~1 g) se mezcló con 30 ml de solución de trabajo de hexano-etanol-acetona-tolueno (10:06: 07:07, v: v: v: v) y agitando durante 1 h. Se añadió una alícuota de 5 ml de solución de NaOH 40% y la saponificación se llevó a cabo bajo condiciones de oscuridad, con atmósfera de nitrógeno y durante 16 h. Pasado este tiempo se agregaron 15 ml de hexano y se agitó a 3500 rpm durante 10 min. Inmediatamente se agregaron 15 ml de sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y agitando por 1 min. A continuación, la solución se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min y se recogió el sobrenadante. El residuo se sometió a varias extracciones con 15 ml de hexano hasta conseguir una muestra transparente. Los extractos obtenidos se almacenaron en viales color ámbar con tapa, se rotularon y guardaron en espacio refrigerado a 277,15 K hasta su uso. Finalmente, el contenido de carotenoides totales se determinó como se expuso en la sección de metodología.

## Anexo D. Curvas de calibración

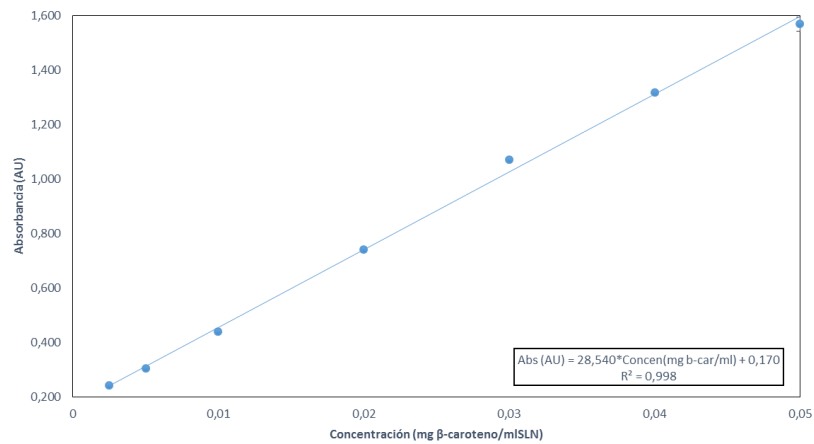
- ❖ Curva de calibración para determinar el contenido de polifenoles totales



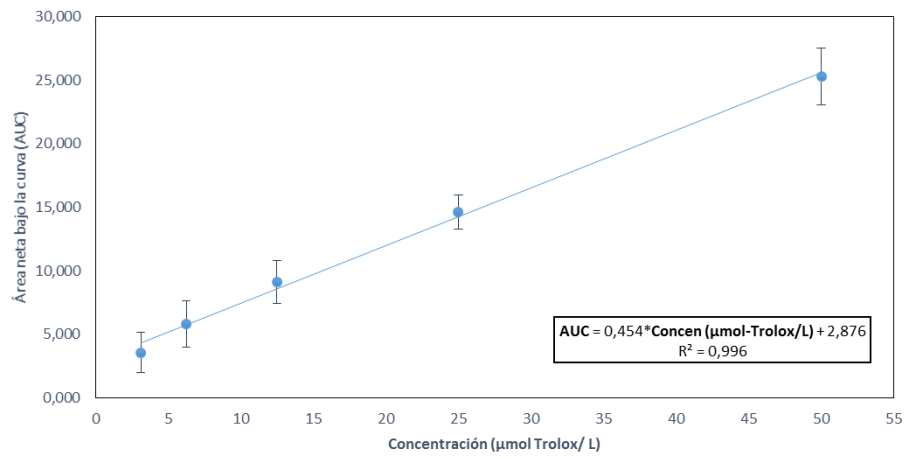
- ❖ Curva de calibración para determinar el contenido de flavan-3-oles totales



- ❖ Curva de calibración para determinar el contenido de carotenoides totales



- ❖ Curva de calibración para determinar la capacidad antioxidante (ensayo ORAC)



**Anexo E.** Variación del contenido de polifenoles en función del tamaño de partícula y tiempo de extracción

<b> Tp (mm) (Promedio)</b>	<b>text (min)</b>	<b>CPT (mg EAG/gEL)</b>
0,223	200	16,84
0,223	200	17,22
0,223	120	17,73
0,223	120	20,38
0,223	40	14,82
0,223	40	12,76
0,677	120	20,34
0,677	120	21,59
0,677	40	13,84
0,677	40	13,65
0,677	200	17,92
0,677	200	18,45
1,785	40	13,12
1,785	40	14,50
1,785	200	18,98
1,785	200	19,70
1,785	120	18,59
1,785	120	16,82
0,677	120	19,89
0,677	120	23,17
0,677	120	18,88
0,677	120	19,75

## Anexo F. Prueba de Tukey para el diámetro de partícula y tiempo de extracción

40 min	120 min	200 min
One-way ANOVA: C2 versus C1	One-way ANOVA: C2 versus C1	One-way ANOVA: C2 versus C1
Source DF SS MS F P	Source DF SS MS F P	Source DF SS MS F P
C1 2 0,00 0,00 0,00 0,998	C1 2 54,85 27,43 15,64 0,026	C1 2 5,344 2,672 16,97 0,023
Error 3 3,08 1,03	Error 3 5,26 1,75	Error 3 0,472 0,157
Total 5 3,08	Total 5 60,11	Total 5 5,816
S = 1,013 R-Sq = 0,15% R-Sq(adj) = 0,00%	S = 1,324 R-Sq = 91,25% R-Sq(adj) = 85,42%	S = 0,3968 R-Sq = 91,88% R-Sq(adj) = 86,46%
Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev	Individual 95% CIs For Mean Based on Pooled StDev
Level N Mean StDev	Level N Mean StDev	Level N Mean StDev
1 2 13,792 1,454	1 2 19,059 1,878	1 2 17,036 0,269
2 2 13,749 0,130	2 2 20,970 0,887	2 2 18,187 0,374
3 2 13,818 0,973	3 2 13,818 0,973	3 2 19,348 0,510
12,0 13,2 14,4 15,6	14,0 17,5 21,0 24,5	16,8 18,0 19,2 20,4
Pooled StDev = 1,013	Pooled StDev = 1,324	Pooled StDev = 0,397
Grouping Information Using Tukey Method	Grouping Information Using Tukey Method	Grouping Information Using Tukey Method
C1 N Mean Grouping	C1 N Mean Grouping	C1 N Mean Grouping
3 2 13,818 A	2 2 20,970 A	3 2 19,3479 A
1 2 13,792 A	1 2 19,059 A B	2 2 18,1866 A B
2 2 13,749 A	3 2 13,818 B	1 2 17,0362 B
Means that do not share a letter are significantly different.	Means that do not share a letter are significantly different.	Means that do not share a letter are significantly different.
Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals All Pairwise Comparisons among Levels of C1	Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals All Pairwise Comparisons among Levels of C1	Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals All Pairwise Comparisons among Levels of C1
Individual confidence level = 97,50%	Individual confidence level = 97,50%	Individual confidence level = 97,50%
C1 = 1 subtracted from:	C1 = 1 subtracted from:	C1 = 1 subtracted from:
C1 Lower Center Upper	C1 Lower Center Upper	C1 Lower Center Upper
2 -4,275 -0,042 4,190	2 -3,622 1,911 7,444	2 -0,5079 1,1503 2,8085
3 -4,207 0,026 4,258	3 -10,775 -5,241 0,292	3 0,6535 2,3117 3,9699
-2,5 0,0 2,5 5,0	-7,0 0,0 7,0 14,0	-2,0 0,0 2,0 4,0
C1 = 2 subtracted from:	C1 = 2 subtracted from:	C1 = 2 subtracted from:
C1 Lower Center Upper	C1 Lower Center Upper	C1 Lower Center Upper
3 -4,165 0,068 4,301	3 -12,686 -7,152 -1,619	3 -0,4969 1,1613 2,8196
-2,5 0,0 2,5 5,0	-7,0 0,0 7,0 14,0	-2,0 0,0 2,0 4,0

**Anexo G. Compuestos cuantificados para las isotermas de extracción**

<b>T</b> <b>(K)</b>	<b>P</b> <b>(MPa)</b>	<b>X</b> <b>(% kg/kg)</b>	<b>CPT</b>		<b>CFT</b>		<b>CCT</b>		<b>Rend</b>
308,15	10	2	17,19	± 0,11	3,31	± 0,16	6,93	± 0,10	0,92
		11	26,49	± 2,34	6,28	± 0,26	25,23	± 0,08	1,53
		20	33,27	± 2,11	6,38	± 0,35	29,27	± 1,70	2,06
	15	2	22,03	± 1,23	3,22	± 0,19	18,74	± 0,84	1,18
		11	27,02	± 2,38	8,60	± 0,51	37,67	± 1,56	1,48
		20	33,89	± 2,75	11,51	± 0,07	50,16	± 0,00	2,25
	20	2	22,86	± 1,29	3,51	± 0,10	24,00	± 0,11	1,16
		11	31,39	± 2,23	8,54	± 0,38	50,86	± 0,20	1,75
		20	35,11	± 1,57	12,89	± 0,51	64,35	± 1,54	2,30
		2	14,53	± 1,05	3,02	± 0,40	1,91	± 0,05	0,50
		11	21,72	± 2,44	4,91	± 0,39	19,99	± 0,15	1,09
		20	24,30	± 1,07	4,68	± 0,10	22,93	± 0,78	2,01
313,15	15	2	15,29	± 0,46	2,87	± 0,02	9,23	± 0,03	0,85
		11	25,22	± 1,31	6,62	± 0,28	32,34	± 0,82	1,38
		20	24,13	± 1,65	7,67	± 0,47	41,81	± 2,61	2,14
	20	2	20,92	± 3,64	3,05	± 0,13	7,12	± 0,13	0,81
		11	29,92	± 3,33	5,58	± 0,27	43,66	± 0,11	1,50
		20	28,92	± 0,71	8,78	± 0,44	49,63	± 3,22	2,09
	10	2	4,40	± 0,31	2,08	± 0,01	0,49	± 0,02	0,39
		11	10,46	± 0,99	2,90	± 0,09	10,58	± 0,48	0,90
		20	19,22	± 0,27	4,44	± 0,25	15,96	± 0,07	1,93
		2	5,85	± 0,67	2,58	± 0,12	2,51	± 0,03	0,70
		11	21,02	± 2,44	4,76	± 0,30	10,46	± 0,71	1,07
		20	21,42	± 0,94	5,69	± 0,82	21,91	± 0,92	2,10
318,15	15	2	7,05	± 0,30	2,05	± 0,27	0,99	± 0,00	0,53
		11	29,92	± 3,33	4,76	± 0,59	23,14	± 0,94	1,30
	20	11	29,92	± 3,33	4,76	± 0,59	23,14	± 0,94	1,30
		20	21,64	± 1,63	6,74	± 0,71	34,98	± 2,34	2,02

## Anexo H. Análisis de varianza ANOVA

### ❖ Análisis de varianza para el contenido de polifenoles totales

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
<i>A:T (K)</i>	963,665	1	963,6648	189,7426	0,000000
<i>AA</i>	6,853	1	6,8533	1,3494	0,255938
<i>B:P (MPa)</i>	107,995	1	107,9954	21,2640	0,000094
<i>BB</i>	0,061	1	0,0613	0,0121	0,913393
<i>C: X (%)</i>	816,082	1	816,0821	160,6840	0,000000
<i>XX</i>	38,194	1	38,1935	7,5202	0,010896
<i>AB</i>	0,314	1	0,3138	0,0618	0,805640
<i>AC</i>	4,773	1	4,7729	0,9398	0,341267
<i>BC</i>	2,634	1	2,6344	0,5187	0,477817
<i>Error total</i>	132,049	26	5,0788		
<i>Falta de ajuste</i>	122,669	17	7,2158	6,9237	0,002833
<i>Error puro</i>	9,380	9	1,0422		
<i>Total (corr.)</i>	1985,413	35			

### ❖ Análisis de varianza para el contenido de flavan-3-oles totales

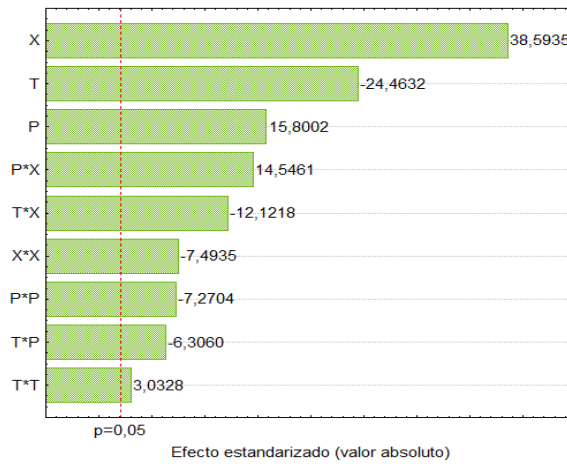
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>A:T (K)</i>	1,13722	1	1,137225	178,604	0,000001
<i>AA</i>	0,03943	1	0,039427	6,192	0,037617
<i>B: P (MPa)</i>	0,44337	1	0,443367	69,632	0,000032
<i>BB</i>	0,02494	1	0,024940	3,917	0,083163
<i>C: X (%)</i>	9,85594	1	9,855945	1547,897	0,000000
<i>XX</i>	0,03568	1	0,035682	5,604	0,045439
<i>AB</i>	0,04173	1	0,041727	6,553	0,033650
<i>AC</i>	0,15016	1	0,150160	23,583	0,001262
<i>BC</i>	0,01699	1	0,016992	2,669	0,140981
<i>Error total</i>	0,62311	26	0,023966		
<i>Falta de ajuste</i>	0,57217	18	0,031787	4,992	0,012944
<i>Error puro</i>	0,05094	8	0,006367		
<i>Total (corr.)</i>	11,94646	35			

### ❖ Análisis de varianza para el contenido de carotenoides totales

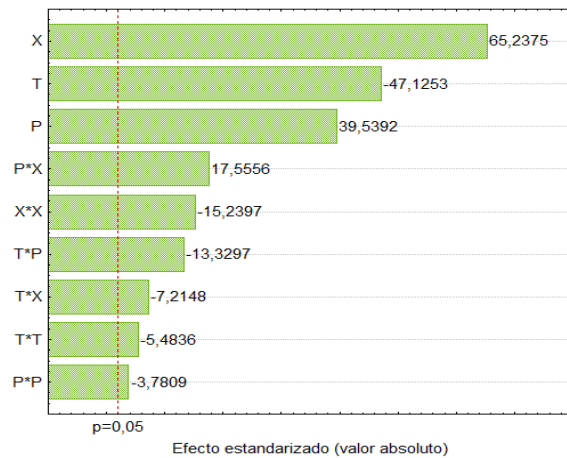
<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<i>A:T (K)</i>	1,13722	1	1,137225	178,604	0,000001
<i>AA</i>	0,03943	1	0,039427	6,192	0,037617
<i>B: P (MPa)</i>	0,44337	1	0,443367	69,632	0,000032
<i>BB</i>	0,02494	1	0,024940	3,917	0,083163
<i>C: X (%)</i>	9,85594	1	9,855945	1547,897	0,000000
<i>XX</i>	0,03568	1	0,035682	5,604	0,045439
<i>AB</i>	0,04173	1	0,041727	6,553	0,033650
<i>AC</i>	0,15016	1	0,150160	23,583	0,001262
<i>BC</i>	0,01699	1	0,016992	2,669	0,140981
<i>Error total</i>	0,62311	26	0,023966		
<i>Falta de ajuste</i>	0,57217	18	0,031787	4,992	0,012944
<i>Error puro</i>	0,05094	8	0,006367		
<i>Total (corr.)</i>	11,94646	35			

## Anexo I. Diagramas de Pareto

### ❖ Diagrama de Pareto para el contenido de flavan-3-oles totales



### ❖ Diagrama de Pareto para el contenido de carotenoides totales



### ❖ Diagrama de Pareto para el rendimiento

