

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS**  
**ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos para  
optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos**

Extracción y caracterización de los flavonoides obtenidos de la cáscara del fruto de cacao  
(*Theobroma cacao L.*) para su valorización

Elaborado por: Valeria Arce Marín  
Carné B10515

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio  
Noviembre, 2019

## **TRIBUNAL EXAMINADOR**

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Tecnología de Alimentos.

Elaborado por: Valeria Arce Marín

Aprobado por:

---

Ph.D. Eric Wong González

Presidente del Tribunal

---

Ing. Eduardo Thompson Vicente

Director del Proyecto

---

M. Sc. Lea Wexler Goering

Asesora del Proyecto

---

Lic. Wilfredo Flores del Valle

Asesor del Proyecto

---

M. Sc. Ana Lucía Mayorga Gross

Profesora designada

## **DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL**

El presente trabajo tiene un nivel de confidencialidad parcial, pues se determinaron condiciones para obtener un extracto que puede tener una aplicación comercial. Por lo tanto, los resultados se expresan con variables codificadas. El resto de la información es de carácter público.

**DEDICATORIA**

*A mi ángel de la guarda, mi Tía Xinia Marín González, quien fue la que me puso en este camino.*

## ÍNDICE GENERAL

TRIBUNAL EXAMINADOR .....	i
DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL .....	ii
DEDICATORIA.....	iii
ÍNDICE GENERAL .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
RESUMEN .....	xi
1. JUSTIFICACIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
2.1 Objetivo general .....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
3. MARCO TEÓRICO .....	5
3.1. Valorización de subproductos en la industria alimentaria. ....	5
3.2. Generalidades del cacao .....	6
3.2.1 Producción en Costa Rica .....	6
3.2.2 Subproductos del procesamiento de cacao .....	6
3.2.3 Cáscara del fruto de cacao (CFC).....	7
3.2.3.1 Composición de la CFC .....	8
3.2.3.2 Compuestos bioactivos en la CFC .....	9
3.2.3.3 Enzimas en la CFC.....	9
3.3 Compuestos fenólicos .....	10
3.3.1 Polifenoles .....	10
3.3.2 Flavonoides.....	11
3.3.2.1 Flavonoides en la CFC.....	13
3.3.3 Capacidad antioxidante .....	14
3.3.4 Efecto de flavonoides en la salud .....	15

3.3.5 Métodos de análisis de flavonoides .....	15
3.4. Extracción de compuestos bioactivos de matrices vegetales .....	17
3.4.1 Extracción de flavonoides .....	18
3.4.2 Variables de extracción .....	18
3.4.2.1 Tipo de solvente.....	18
3.4.2.2 Relación sustrato solvente (R <sub>ss</sub> ).....	19
3.4.2.3 Temperatura .....	20
3.4.2.4 Concentración de ácido.....	20
3.5. Evaluación del proceso de extracción.....	21
3.5.1 Diseño experimental de mezclas.....	21
3.5.2 Diseño central compuesto (DCC).....	24
3.5.3 Metodología de superficie de respuesta (MSR) .....	25
3.6. Caracterización de extractos vegetales .....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
4.1 Localización .....	27
4.2 Materias prima .....	27
4.3 Metodología .....	27
4.3.1 Evaluación de las condiciones de escaldado. ....	27
4.3.2. Preparación del sustrato .....	29
4.3.3 Validación del método de cuantificación de flavonoides. ....	30
4.3.4. Evaluación del efecto de la combinación de solventes (acetona, agua, etanol 95%) en la extracción de los flavonoides.....	32
4.3.5. Evaluación del efecto de las condiciones de operación (R <sub>ss</sub> , temperatura y concentración de ácido clorhídrico) sobre la extracción de flavonoides de la CFC. ....	36
4.3.6. Caracterización de los componentes del extracto.....	39
4.3.6.1 Contenido de sólidos totales. ....	39
4.3.6.2 Azúcares simples.....	40
4.3.6.3 Cenizas totales .....	40

4.3.6.4 pH .....	41
4.3.6.5 Polifenoles totales (PFT).....	41
4.3.6.6 Contenido de flavonoides .....	41
4.3.6.7 Capacidad antioxidante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) .....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	43
5.1. Condiciones de escaldado para la inactivación de las enzimas de deterioro de los polifenoles en el pericarpio de la cáscara del fruto de cacao (PCFC) a utilizar como sustrato de extracción. ....	43
5.2. Validación del método de cuantificación de flavonoides .....	45
5.3 Evaluación de la combinación de solventes (acetona, agua y etanol 95%) para obtener el extracto con la mayor concentración de flavonoides, mediante un diseño experimental de mezclas restringido. ....	47
5.4 Evaluación de las condiciones de extracción (Rss, temperatura y Cn HCl) de flavonoides mediante un DCC.....	53
5.5 Caracterización fisicoquímica del extracto de flavonoides obtenido del PCFC. ....	60
6. CONCLUSIONES.....	65
7. RECOMENDACIONES .....	66
8. BIBLIOGRAFÍA .....	68
9. ANEXOS .....	76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del fruto de cacao. Los granos oscuros que se señalan están fermentados, a diferencia de las semillas con pulpa señaladas dentro del fruto. ....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema indicativo de las capas de la CFC. ....	8
<b>Figura 3.</b> Estructura base de los flavonoides. ....	12
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los flavonoides. ....	13
<b>Figura 5.</b> Formación del complejo cromogénico por quelación del ión aluminio con el grupo o-dihidroxilo de las catequinas. ....	16
<b>Figura 6.</b> Región experimental de un diseño simplex centroide, utilizado para la optimización de los solventes de una extracción. Los números representan las mezclas de solventes a evaluadas. ....	22
<b>Figura 7.</b> Región experimental de un diseño de mezclas restringido utilizado para la optimización de los solventes de una extracción. ....	23
<b>Figura 8.</b> Procedimiento de preparación del sustrato de extracción a partir del fruto de cacao. ...	29
<b>Figura 9.</b> Proceso de extracción de flavonoides a partir del sustrato obtenido del pericarpio del fruto de cacao para evaluación de mezcla óptima de solventes. ....	32
<b>Figura 10.</b> Equipo de extracción utilizado para la obtención de flavonoides a partir del pericarpio del fruto de cacao. ....	33
<b>Figura 11.</b> Diseño de mezclas restringido utilizado para la optimización de los solventes de extracción de solventes. ....	35
<b>Figura 12.</b> Proceso de extracción de flavonoides a partir del sustrato obtenido (PCFC) para evaluación del efecto de las condiciones de operación (Rss, temperatura y Cn HCl). ....	36
<b>Figura 13.</b> Diagrama de Pareto para la estimación del efecto de los solventes en la extracción de flavonoides del PCFC en el modelo obtenido. ....	49
<b>Figura 14.</b> Superficies de respuesta de los solventes estudiados para la extracción de flavonoides del PCFC (escala de colores indica mg EE/g de extracto). Las flechas en azul indican las zonas de máxima extracción. ....	50
<b>Figura 15.</b> Diagrama de Pareto del efecto de las variables de extracción de flavonoides del PCFC. ....	55
<b>Figura 16.</b> Superficie de respuesta de las condiciones de extracción estudiadas para la extracción de flavonoides del PCFC (escala de colores indica mg EE/g de sustrato). Las variables se representan codificadas. ....	56
<b>Figura 17.</b> Contenido de PFT reportados en estudios previos de la extracción a partir de la CFC. ...	61

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro I.</b> Condiciones de tiempo, temperatura y concentración de ácido cítrico evaluadas en el escaldado del pericarpio del fruto de cacao. ....	28
<b>Cuadro II.</b> Combinación de solventes a evaluar en la extracción de flavonoides del pericarpio del fruto de cacao. ....	34
<b>Cuadro III.</b> Niveles de factores a evaluar para la optimización de las condiciones de extracción de flavonoides.....	37
<b>Cuadro IV.</b> Descripción de tratamientos aplicados para la optimización de las condiciones de extracción de los flavonoides a partir del sustrato PCFC.....	38
<b>Cuadro V.</b> Resultado de la evaluación cualitativa de la actividad enzimática (ausencia/presencia) en el PCFC sometido a diferentes tratamientos de escaldado. ....	43
<b>Cuadro VI.</b> Parámetros de la ecuación de regresión lineal para la cuantificación de flavonoides como equivalentes de (-)-epicatequina.....	45
<b>Cuadro VII.</b> LD y LQ del método de cuantificación de flavonoides evaluado. ....	46
<b>Cuadro VIII.</b> Parámetros de precisión obtenidos para el método de cuantificación de flavonoides evaluado.....	46
<b>Cuadro IX.</b> Concentración promedio de flavonoides en extractos obtenidos mediante un diseño de mezclas restringido. ....	47
<b>Cuadro X.</b> Parámetros de evaluación para la selección del modelo de mejor ajuste <sup>1</sup> .....	48
<b>Cuadro XI.</b> Concentración de flavonoides predicha con un nivel de confianza del 95% por el modelo de mezcla óptima de solventes y lograda en corridas de verificación. ....	52
<b>Cuadro XII.</b> Concentración de flavonoides obtenida al variar las condiciones Rss, temperatura y Cn HCl en extracción a partir del PCFC. ....	53
<b>Cuadro XIII.</b> Parámetros estadísticos del modelo cuadrático de condiciones de extracción de flavonoides a partir del PCFC.....	54
<b>Cuadro XIV.</b> Condiciones óptimas de extracción de flavonoides del PCFC predichas por la superficie de respuesta del modelo cuadrático obtenido. ....	59
<b>Cuadro XV.</b> Comparación entre la concentración de flavonoides predicha por el modelo y la obtenida en las corridas de verificación, bajo las condiciones óptimas de extracción.....	59
<b>Cuadro XVI.</b> Análisis fisicoquímicos para caracterización del extracto de flavonoides del PCFC.....	60

<b>Cuadro XVII.</b> Prueba de adición de catecol 1%, a muestras de pericarpio del fruto de cacao sometidas a diferentes condiciones de temperatura, tiempo y concentración de ácido cítrico en operación de escaldado. A los trozos de la izquierda de cada imagen se les adicionó la solución de catecol al 1%, a los de la derecha no. <sup>1</sup> .....	76
<b>Cuadro XVIII.</b> Ecuaciones utilizadas para la cuantificación de flavonoides en los extractos obtenidos en los tratamientos de cada objetivo específico, obtenidas a partir de las respectivas curvas de calibración.....	77
<b>Cuadro XIX.</b> Análisis de varianza de los modelos de regresión evaluados para la selección del que mejor representa los resultados experimentales.....	77
<b>Cuadro XX.</b> Valores p de coeficientes factores de ecuación del modelo cuadrático de mezcla de solventes de extracción de flavonoides. ....	78
<b>Cuadro XXI.</b> Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta de las variables de extracción de flavonoides de la CFC. ....	78
<b>Cuadro XXII.</b> Valores p de coeficientes de factores de ecuación del modelo cuadrático de condiciones de extracción de flavonoides.....	79

## ABREVIATURAS

**ABTS:** Ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (por sus siglas en inglés)

**bh:** Base húmeda

**bs:** Base seca

**CATIE:** Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

**CFC:** Cáscara del fruto de cacao

**DCC:** Diseño central compuesto

**DPPH:** 2, 2'-Difenil-1-picrilhidrazilo (por sus siglas en inglés)

**EAG:** Equivalentes de ácido gálico

**EE:** Equivalentes de (-)-epicatequina

**FRAP:** Poder antioxidante de reducción férrica (por sus siglas en inglés)

**Ha:** hectárea

**HCl:** Ácido clorhídrico

**LC:** Límite de cuantificación

**LD:** Límite de detección

**LDL:** Colesterol de baja densidad (por sus siglas en inglés)

**MSR:** Metodología de superficie de respuesta

**ORAC:** Capacidad de absorción de radicales oxígeno (por sus siglas en inglés)

**p:** Probabilidad

**PCFC:** Pericarpio de la cáscara del fruto de cacao

**$p_{fa}$ :** Probabilidad falta de ajuste

**pH:** Potencial de hidrógeno

**PFO:** Polifenoloxidasas

**PFT:** Polifenoles totales extraíbles

**POX:** Peroxidasas

**RSD:** Desviación estándar entre réplicas por sus siglas en inglés

**Rss:** Relación sustrato solvente.

**$R^2$ :** Coeficiente de determinación

**$R^2_{ajd}$ :** Coeficiente de determinación ajustado

## RESUMEN

Arce Marín, Valeria

Extracción y caracterización de los flavonoides obtenidos de la cáscara del fruto de cacao (*Theobroma cacao L.*) para su valorización.

Tesis Licenciatura en Ingeniería de Alimentos. San José, Costa Rica.

Arce Marín, V. 2019.

92 h.: 17 il.- 80 refs.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar la metodología de procesamiento de la cáscara del fruto de cacao (CFC) para la obtención de extracto de flavonoides con potencial bioactivo, como parte de la valorización de un subproducto de la industria, mediante la evaluación de las condiciones de escaldado para preparar el sustrato de extracción, la optimización de la mezcla de solventes de extracción, y las condiciones relación sustrato-solvente, temperatura y concentración de ácido clorhídrico. El extracto obtenido se caracterizó físicoquímicamente.

La inhibición de las enzimas de deterioro de polifenoles se evaluó cualitativamente mediante una prueba de ausencia/presencia de oscurecimiento al adicionar catecol 1%. Bajo estas condiciones el sustrato de extracción se obtuvo del pericarpio del fruto de cacao de la variedad TSH 565. La mezcla de solventes a evaluar se definió con un diseño de mezclas restringido donde los factores evaluados fueron agua, acetona y etanol 95%, y se optimizó mediante la metodología de superficie de respuesta. El contenido de flavonoides se determinó mediante el método espectrofotométrico con cloruro de aluminio, validado para este fin. Se evaluaron los parámetros de extracción: temperatura, relación solvente sustrato y concentración de empleando un diseño central compuesto y se optimizaron las condiciones usando la metodología de superficie de respuesta. Para la caracterización del extracto se determinó el pH, su contenido de azúcares simples, de cenizas, sólidos totales, polifenoles totales, flavonoides y la capacidad de absorción de radicales oxígeno.

Las condiciones de escaldado encontradas como más adecuadas son una solución acuosa al 1% de ácido cítrico a 90°C por 5 min. En el diseño de mezcla de solventes se obtuvo un modelo cuadrático como el que mejor describe la concentración de flavonoides en el extracto en función de los solventes evaluados. En la ecuación del modelo el factor más significativo fue la interacción

acetona-agua, seguida de la interacción agua-etanol y factor agua pura. La mezcla óptima de extracción fue acetona-agua 60:40. El modelo obtenido predice la concentración de flavonoides en función de los factores solventes de extracción con un nivel de confianza del 95%. El modelo cuadrático obtenido para definir las condiciones óptimas de extracción describe la concentración de flavonoides en el extracto en función de la relación sustrato-solvente, temperatura y concentración de ácido clorhídrico, para los que las condiciones óptimas son 1:16, 43°C y 0,02%, respectivamente. El modelo cuadrático además predice la concentración de flavonoides a extraer en función de las variables estudiadas con un nivel de confianza del 99% % El extracto obtenido mediante las condiciones óptimas presenta un pH de  $4,02 \pm 0,01$ , contenido de azúcares simples  $0,27 \pm 0,02$  g/100 g,  $0,097 \pm 0,006$  g/100 g de cenizas y  $2,00 \pm 0,28$  g /100 g de sólidos totales. El contenido de polifenoles totales fue de  $321 \pm 20$  mg EAG/g sustrato bs, la concentración de flavonoides de  $20,5 \pm 0,9$  mg EE/ g sustrato y la capacidad antioxidante de  $2318 \pm 113$   $\mu$ mol TE/g bs. Se recomienda la concentración y purificación del extracto; el análisis de los flavonoides catequina, quercetina y (-)-epicatequina por HPLC-DAD, la determinación de la capacidad antioxidante por diferentes métodos *in vitro* y el estudio de sus potenciales actividades biológicas.

CÁSCARA DE CACAO; DISEÑO DE MEZCLAS; DISEÑO CENTRAL COMPUESTO; EXTRACCION, FLAVONOIDES; INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA; OPTIMIZACIÓN DE EXTRACCIÓN; METODOLOGÍA DE SUPERFICIES DE RESPUESTA; VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS.

Ing. Eduardo Thompson Vicente

Escuela de Tecnología de Alimentos.

## 1. JUSTIFICACIÓN

La demanda creciente de alimentos asociada con el aumento de la población mundial ha resultado en una gran producción de desechos a lo largo de la cadena alimentaria, al ser considerados como partes no comestibles. Los impactos generados por estos desechos, principalmente ambientales, así como los problemas de malnutrición en el mundo han llevado a la búsqueda de alternativas para su valorización (Revindran y Jaiswal, 2016). En la producción de cacao para la industria del chocolate, se aprovecha aproximadamente el 20 % del fruto, y se obtienen como subproductos la cáscara del fruto de cacao y la cáscara de los granos (Nguyen, 2014). En Costa Rica, para el año 2017, se estimó una producción anual de 700 toneladas métricas de cacao (Comisión Interinstitucional de Cacao, 2018). Dado que la cáscara representa entre un 75-78 % del peso del fruto completo (Nguyen, 2014; Valadez *et al.*, 2018), cerca de 535 500 kg de cáscara se desechan anualmente en las plantaciones del país.

El manejo de estas cáscaras como residuos en las plantaciones es complejo debido a su peso y volumen, y además porque genera, entre otros, problemas como la producción de malos olores, contaminación de suelos y cuerpos de agua, así como la propagación del hongo fitopatógeno *Phytophthora* spp., que es la principal causa de pérdidas económicas de la producción de cacao (Franco *et al.*, 2010; Vriesmann *et al.*, 2011). Estos residuos se podrían aprovechar ya que contienen compuestos bioactivos y nutrientes que pueden ser de valor para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Ameer *et al.*, 2017; Hurtado y Ortiz, 2018; Panak *et al.*, 2018). De estos subproductos del cacao, a nivel de compuestos bioactivos, se han realizado estudios para la obtención de extractos con potencial antioxidante y fibra dietética (Lecumberri *et al.*, 2006; Yapo *et al.*, 2013).

En la cáscara de del fruto de cacao (CFC) se han identificado diversos compuestos fenólicos. Entre estos, Valadez *et al.* (2017) reportan entre los flavonoides cuantificados un 36% de catequina, 21% de quercetina, 21% (-)-epicatequina y los siguientes ácidos fenólicos: gálico (11,3%), cumárico (6,5%) y protocatecuico (4,5%). Además, en el pericarpio del fruto de cacao se han encontrado altos niveles de proantocianidinas solubles e insolubles (170 y 8 mg/g en base seca (bs)) (Campos *et al.*, 2018). En un primer análisis de la cáscara de cacao liofilizada, realizado para el presente proyecto, se encontró un contenido de polifenoles totales (PFT) de 15 319 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de bs de muestra en el pericarpio del fruto, en relación

con 5 082 mg equivalentes de ácido gálico/100 g de muestra bs presentes en el mesocarpio. El contenido de polifenoles del pericarpio es tres veces mayor que el presente en el mesocarpio, lo cual motiva a realizar un estudio de extracción de estos compuestos activos en el pericarpio.

Con el fin de aprovechar los flavonoides presentes en la CFC es importante efectuar su extracción de forma eficiente. Actualmente, no hay un procedimiento establecido para ello, aunque existen estudios que muestran diversos métodos para la extracción. La eficiencia de la extracción depende de factores de la operación tales como la naturaleza del solvente, el pH, la temperatura, la relación solvente soluto (Rss), número de etapas de extracción y características propias del sustrato como su forma y tamaño. En relación con las características propias del sustrato, la actividad enzimática endógena presente en los tejidos vegetales puede provocar degradación de los flavonoides presentes y afectar el rendimiento de extracción; por ello, se deben evitar o prevenir las reacciones relacionadas a la pérdida de los compuestos a extraer (De la Rosa *et al.*, 2010; Ghosh *et al.*, 2013).

Las reacciones de pardeamiento enzimático en las matrices vegetales provocan la oxidación de los polifenoles en presencia de oxígeno por la acción catalítica de las enzimas polifenoloxidasas (PFO) y peroxidasa (POX), que resultan en formación de compuestos coloreados y la pérdida de sus propiedades funcionales. A pesar de que en investigaciones previas de extracción de compuestos fenólicos a partir de la CFC se han aplicado tratamientos para evitar su pérdida por reacciones enzimáticas de deterioro, no se han estudiado las condiciones de tiempo, temperatura y concentración de ácido en la operación de escaldado adecuadas para disminuir las pérdidas al extraer los flavonoides presentes en la CFC.

Diferentes estudios muestran una variedad de combinaciones de solventes y condiciones que se pueden usar para extraer los polifenoles de la CFC (Lecumberri *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2012; Yapó *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2015; Sotelo *et al.*, 2015; Valadez *et al.*, 2017). Sin embargo, ninguno se ha enfocado en obtener la mezcla óptima de disolventes ni las condiciones óptimas de temperatura de extracción, concentración de ácido ni relación sustrato-solvente, para obtener el mayor rendimiento de extracción de estos compuestos a partir de la CFC.

En la optimización de extracción de compuestos fenólicos a partir de diferentes matrices vegetales se han empleado herramientas estadísticas de experimentos como el diseño de mezclas y el diseño central compuesto (Santos *et al.*, 2018). Con la metodología de superficie de respuesta se logra obtener a partir de las variables que se estudian, un modelo de regresión matemático que

describe el comportamiento de determinada variable respuesta, a partir del cual se pueden estimar valores para su optimización. Estos diseños experimentales presentan la ventaja que permiten estudiar más de un factor a la vez y sus posibles interacciones, además de facilitar la estimación de los efectos principales (Reid, 2000).

La caracterización de un extracto de compuestos fenólicos obtenido de un sustrato como la CFC mediante el análisis de propiedades como su pH, contenido de azúcares simples, cenizas, sólidos totales, PFT y capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés) permite identificar la naturaleza de las sustancias solubles presentes en el extracto y por tanto, brinda una idea de la pureza y requerimientos de purificación del extracto obtenido.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar la metodología de procesamiento de la CFC para la obtención de un extracto de flavonoides con potencial antioxidante para su posible utilización en el desarrollo de alimentos funcionales. Lo anterior, por medio del establecimiento de las condiciones de escaldado de la cáscara de los frutos de cacao para inactivar las enzimas de deterioro, y por medio de la optimización de las condiciones del proceso de extracción utilizando como herramientas un diseño experimental de mezclas y un diseño central compuesto y sus superficies de respuesta.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Establecer las condiciones de procesamiento de la cáscara del fruto de cacao (CFC) para la obtención de un extracto de flavonoides.

### **2.2 Objetivos específicos**

**2.2.1** Establecer las condiciones de escaldado para la inactivación de las enzimas de deterioro de los polifenoles en la CFC a utilizar como sustrato de extracción.

**2.2.2** Identificar la mejor combinación de solventes (agua, etanol y acetona) para obtener el extracto con la mayor concentración de flavonoides, a partir de un diseño experimental de mezclas restringido.

**2.2.3** Definir las condiciones de la operación de extracción (relación sustrato solvente, temperatura y concentración de ácido clorhídrico) para la obtención y caracterización de un extracto de flavonoides mediante un diseño central compuesto.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Valorización de subproductos en la industria alimentaria.

Se consideran como residuos de los alimentos cualquier parte de las materias primas o de los productos alimenticios que se descartan por parte de productores, distribuidores, intermediarios o consumidores debido a que no son útiles para el procesamiento, finalizó su vida útil, presentan daños o son deformes (Kosseva y Webb, 2013). Su generación ha aumentado con el crecimiento de la población mundial y de las actividades agroindustriales. Debido a su contenido nutricional y a los problemas ambientales que generan, estos residuos o subproductos se han convertido en una materia prima de interés para su aprovechamiento. En la búsqueda de valorización de los subproductos que derivan de la industria alimentaria, se han desarrollado productos de valor comercial como biocombustibles, enzimas, ácidos orgánicos, biopolímeros, nutraceuticos y fibra dietética (Revindran y Jaiswal, 2016).

Particularmente, en el procesamiento de frutas y vegetales se desechan entre un 25 a 30% de subproductos, principalmente semillas, cáscaras, cortezas y bagazo, los cuales son fuente de compuestos con potencial bioactividad tales como carotenoides, polifenoles, fibra dietética, vitaminas y enzimas, entre otros. Estos fitoquímicos se pueden utilizar en diferentes industrias, incluyendo la de alimentos funcionales y enriquecidos, la farmacéutica y de productos para la salud y la textil (Sagar *et al.*, 2018). A partir de los residuos de alimentos y subproductos agroindustriales se pueden obtener extractos ricos en polifenoles con diversas potenciales aplicaciones dadas sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, entre ellas fortificantes o suplementos nutricionales (Kowalska *et al.*, 2017).

En el procesamiento del cacao para la industria del chocolate, se aprovecha entre el 20-25% del fruto fresco, y se obtienen como subproductos la cáscara del fruto de cacao y la cáscara de los granos. En Costa Rica el año 2017 se estimó una producción anual de 700 toneladas métricas de cacao (Comisión Interinstitucional de Cacao, 2018). Dado que la cáscara representa entre un 67-78% del peso del fruto completo (Nguyen, 2014; Valadez *et al.* 2018), si se aplica este porcentaje a la producción mencionada anteriormente, cerca de 535500 kg de cáscara se desechan anualmente en el país. Sin embargo, en algunas plantaciones se aprovecha para producir abonos o materiales alternativos para empaque.

### 3.2. Generalidades del cacao

Se cree que esta especie es originaria de la región amazónica y que se extendió desde Sudamérica hasta México (CONABIO, 2019). Fue cultivado y utilizado por los mayas, aztecas y olmecas como moneda de intercambio, y como base para la elaboración de una bebida amarga. Las principales variedades que se cultivan a nivel mundial son la Forastero, Criollo, Trinitario y Nacional. En 2010 la fundación Mundial de Cacao (World Cocoa Foundation) estimó que entre 40 a 50 millones de personas en el mundo dependen de la producción de cacao (Afoakwa, 2014).

El cacao (*Theobroma cacao*) se cultiva principalmente en África, Asia y Latinoamérica; siendo Costa de Marfil y Ghana los principales productores mundiales (ICCO, 2017). Para el año 2018 la Organización Internacional de Cacao, estimó una producción de cacao de 4,59 millones de toneladas (ICCO, 2018). Los semillas con la pulpa (cacao en baba) del fruto se procesan mediante la fermentación, secado, tostado, molienda, prensado y en algunos procesos alcalinización para obtener licor de cacao, cocoa en polvo y manteca de cacao. Estos productos son demandados, principalmente, por las industrias de confitería, de bebidas y cosmética (Shavez *et al.*, 2017).

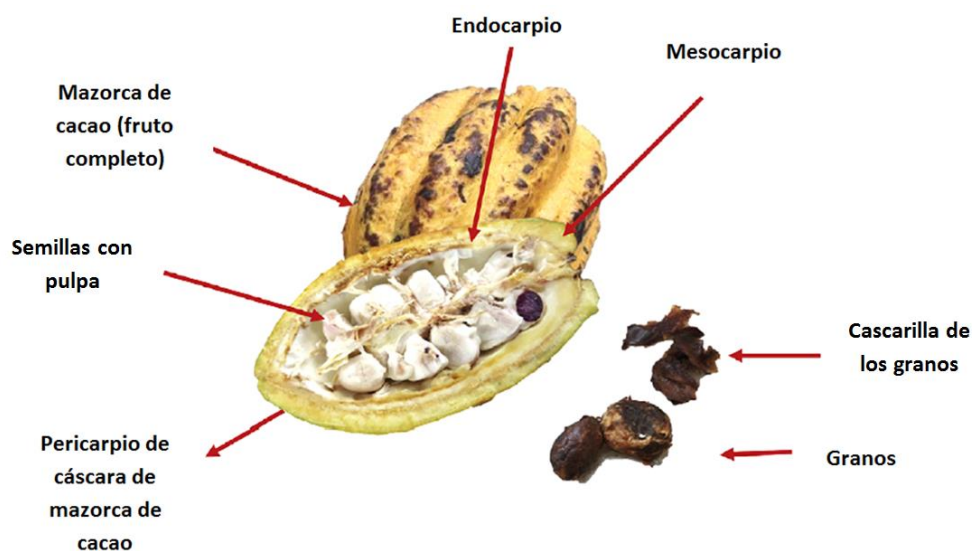
#### 3.2.1 Producción en Costa Rica

En Costa Rica, el cultivo de cacao se realiza en las provincias de Limón, Alajuela y Puntarenas, para un aproximado de 3169,6 ha sembradas por pequeños productores (con fincas entre 2-5 ha), predominantemente. La actividad cacaotera se centra en la región Huetar Caribe, con un 43,3% de las plantas. Durante algunos años la producción se vio afectada principalmente, por el efecto de la enfermedad moniliasis (*Moniliophthora roreri*) (Carmioli, 2017). Con el Programa de Mejoramiento Genético en Cacao del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) se ha mejorado el híbrido trinitario, el mayormente cultivado, para lograr tolerancia a la moniliasis y al hongo de pudrición negra (*Phytophthora palmivora*), así como para lograr una alta producción y buena calidad sensorial (Carmioli, 2017).

#### 3.2.2 Subproductos del procesamiento de cacao

En la producción de cacao para la industria del chocolate, se aprovecha cerca el 20% del peso del fruto fresco y se desechan la cascara del fruto (CFC) y la cáscara de los granos (Nguyen, 2015), que se pueden apreciar en la Figura 1. La CFC se descarta en las plantaciones de cacao

luego de remover la pulpa con las semillas (cacao en baba) para ser fermentadas como parte del proceso de producción de derivados del cacao, favoreciendo así la propagación de hongos perjudiciales para el cultivo. La cascarilla de los granos, que se obtiene después de las etapas de secado y tostado de estos, ha sido uno de los subproductos más estudiados, donde se han encontrado la presencia de compuestos antioxidantes, principalmente catequina, epicatequina y antocianidinas (Nguyen, 2015; Okiyama *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2019).

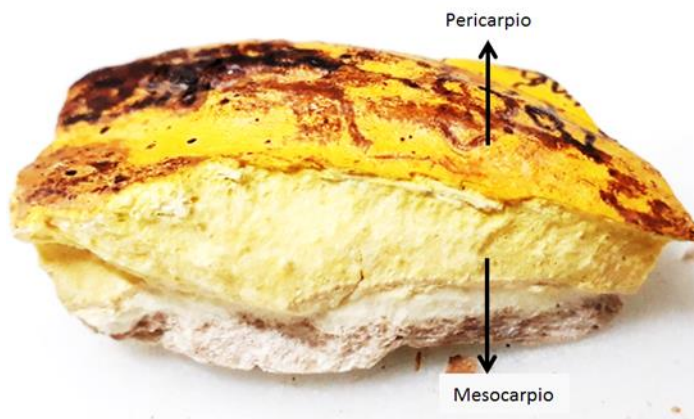


**Figura 1.** Estructura del fruto de cacao. Los granos oscuros que se señalan están fermentados, a diferencia de las semillas con pulpa señaladas dentro del fruto (tomada de Campos *et al.*, 2018).

### 3.2.3 Cáscara del fruto de cacao (CFC)

La CFC se ha descrito como un material natural laminado compuesta de endocarpio, mesocarpio y epicarpio o pericarpio, como se aprecia en la Figura 2. El endocarpio cumple una función protectora de los granos de cacao y está compuesto por proteína, lípidos y fibra. El mesocarpio tiene la función estructural de mantener los granos en su lugar y está compuesto principalmente de fibra; mientras que el pericarpio es la capa exterior con un espesor de 1-3 mm a las 18 semanas después de la polinización, está compuesto mayoritariamente de hemicelulosa y minerales. (Sobamiwa y Longe, 1994; Babatope, 2005). En el pericarpio que representa aproximadamente un 25% del peso de la CFC; se han encontrado altos niveles de

proantocianidinas solubles e insolubles, en comparación con los granos, las flores y las hojas del mismo árbol, así como la presencia de los flavonoides epicatequina (30 mg/g bs) y catequina (0,5 mg /g bs) (Liu *et al.*, 2013).



**Figura 2.** Esquema indicativo de las capas de la CFC.

La CFC constituye entre un 67-78% del peso de la fruta, es el principal subproducto de la industria cacaotera y se estima que por cada tonelada de granos secos de cacao se producen 10 toneladas de CFC (Campos *et al.*, 2018). Es dura al tacto y su coloración varía de verde a naranja-rojiza, dependiendo de su grado de madurez y de la variedad taxonómica. Entre las aplicaciones que se han estudiado para el aprovechamiento de la CFC Campos *et al.* (2018), mencionan la extracción de sustancias aromáticas, tratamientos para la piel y el cabello, estimulante del apetito en animales, goma vegetal y texturizante, agente antibacterial, producción de nanopartículas larvicidas y antioxidantes, agente encapsulante, síntesis del endulzante xilitol, todos estos con aplicaciones en las industrias alimentaria, dermatológica y cosmética, médica y farmacéutica. Además, se ha aprovechado para obtener diversos compuestos como un pigmento poliflavonoglucósido, espuma de poliuretano para uso hortícola, pectinas (Franco *et al.*, 2010; Vriesmann *et al.*, 2011), alimento para animales, fertilizante orgánico (Crescente *et al.* 1999). A nivel de compuestos bioactivos se ha obtenido extractos y fibra dietética con potencial antioxidante (Lecumberri *et al.*, 2006; Yapo *et al.*, 2013).

### 3.2.3.1 Composición de la CFC

La composición química de la CFC varía según diferentes estudios realizados. En la compilación de referencias realizada por Campos *et al.* (2018) se reporta un contenido de

humedad de aproximadamente un 80%; 4,2% bs de proteína; 8,4% bs de cenizas; 2,3% bs de lípidos y un 29,0% de carbohidratos totales, de los cuáles la fibra cruda representa cerca de un 16,24% de la composición total. Las diferencias en composición se deben a la variedad de cacao y su grado de madurez al analizarlo.

### **3.2.3.2 Compuestos bioactivos en la CFC**

Los compuestos bioactivos son compuestos químicos presentes en pequeñas cantidades en las plantas los cuáles se ha demostrado que tienen un efecto beneficioso en la salud al ser consumidos regularmente (Rahman, 2018). Al caracterizar la CFC del cacao se han encontrado, entre estos compuestos bioactivos, fibra dietética (principalmente insoluble) y pectina, compuestos fenólicos solubles y minerales principalmente potasio, fósforo, magnesio y calcio (Vriesmann *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012; Yapó *et al.*, 2013). El contenido de compuestos fenólicos varía según el estudio entre 4,6-7,0 % bs (Vriesmann *et al.*, 2011; Yapó *et al.*, 2013) y, según las condiciones de procesamiento a las que se somete la CFC (Campos *et al.*, 2019).

Entre los compuestos fenólicos estudiados, se han identificado un contenido de flavonoides entre 4,4-22,4 mg equivalentes de rutina por gramo de cáscara (Karim *et al.*, 2011a). Además, extractos obtenidos a partir de este sustrato, han demostrado tener capacidad antioxidante mediante las determinaciones con ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS por sus siglas en inglés), 2, 2'- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH por sus siglas en inglés), poder antioxidante de reducción férrica (FRAP por sus siglas en inglés) y capacidad de absorción de radicales oxígeno (ORAC por sus siglas en inglés), así como actividad antifúngica (Campos *et al.*, 2019).

### **3.2.3.3 Enzimas en la CFC**

En un análisis proteómico en la CFC, Azwan *et al.* (2010), identificaron la presencia tanto de la enzima peroxidasa (POX) como de la polifenoloxidasas (PFO). Ambas son las principales responsables del deterioro del color y del valor nutricional en la mayoría de los tejidos de frutas y vegetales. La PFO es una enzima endógena en frutas y vegetales y cataliza la oxidación de compuestos fenólicos, principalmente catequinas, a quinonas, las cuales al polimerizar producen melanoidinas de coloración café. En la CFC, Valadez *et al.* (2017) evaluaron el efecto de diferentes métodos de secado sobre la actividad de la PFO, el contenido de polifenoles y la

actividad antioxidante en el producto seco. Encontraron que el método de secado con aire caliente solamente reduce la actividad de la PFO en aproximadamente un 30%, pero no provoca inactivación de la enzima. Villamizar y López (2017) también aplicaron un tratamiento térmico para inhibir esta misma enzima en la obtención de polifenoles y fibras a partir de CFC; sin embargo, no detallan las condiciones del tratamiento.

La actividad de estas enzimas se puede inhibir o reducir al cambiar las condiciones de pH y temperatura del sustrato. A nivel industrial, el escaldado es la operación más común para realizar una inactivación térmica de las enzimas. Esta operación desnaturaliza y por tanto inactiva las enzimas. Según Queiroz *et al.* (2008), a temperaturas entre 70-90°C la PFO pierde su actividad catalítica, pero el tiempo de tratamiento térmico depende del sustrato en el que se encuentre. También, se pueden utilizar agentes químicos que reducen o inactivan la actividad enzimática, y por tanto, evitan la degradación y el pardeamiento de los polifenoles; o se emplea la combinación de diferentes métodos de inhibición/inactivación. Los agentes químicos se clasifican en agentes reductores, quelantes e inhibidores de enzimas. La resistencia, y por tanto las condiciones de inhibición de la PFO, varían según el sustrato en el que se encuentra, por lo que es preferible evaluar estas condiciones en cada matriz vegetal (Queiroz *et al.* 2008; Sulaiman *et al.* 2015). En el estudio de Sartini *et al.* (2017), se efectuó un pretratamiento para inhibir la actividad enzimática de la CFC: se sumergieron las cáscaras en una solución de ácido cítrico al 1% por 15 minutos antes de secarlas, y como resultado se obtuvo en el producto seco un 24 % más de polifenoles totales (PFT) y un 13% más de flavonoides, en comparación con las cáscaras a las que no se les aplicó el pretratamiento.

### **3.3 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos poseen estructuras con anillos aromáticos, dobles enlaces conjugados y uno o más grupos hidroxilo. Dentro de estos compuestos, el término polifenol se refiere a la unión de al menos dos compuestos fenólicos (Sotelo *et al.*, 2015; Galanakis, 2018).

#### **3.3.1 Polifenoles**

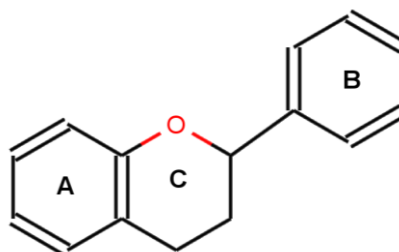
Los polifenoles son los compuestos bioactivos más abundantes en el reino vegetal. Son producidos por el metabolismo secundario de las plantas y están involucrados en los procesos de maduración, mecanismos de defensa y características sensoriales de los alimentos derivados de

plantas. Se clasifican según el número de anillos fenólicos y los elementos estructurales que los unen en flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos, taninos y lignanos (Ignat *et al.*, 2011; Galanakis, 2018).

Se consideran compuestos antioxidantes dado que neutralizan radicales libres al donar electrones o átomos de hidrógeno. Por ello, en los últimos años el interés por estos compuestos ha aumentado, tanto por parte de investigadores como de consumidores, dadas las propiedades preventivas de enfermedades asociadas al estrés oxidativo como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Galanakis, 2018). Además, tienen aplicaciones industriales en alimentos como preservantes y colorantes, en la producción de pinturas, papel y cosméticos (Ignat *et al.*, 2011). En los alimentos, cumplen funciones tales como brindar atributos sensoriales como el color y el sabor astringente. Además se han usado como preservantes al controlar el desarrollo de la rancidez, retardar la formación de productos de oxidación tóxicos, mantener la calidad nutricional y alargar la vida útil de los productos (Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

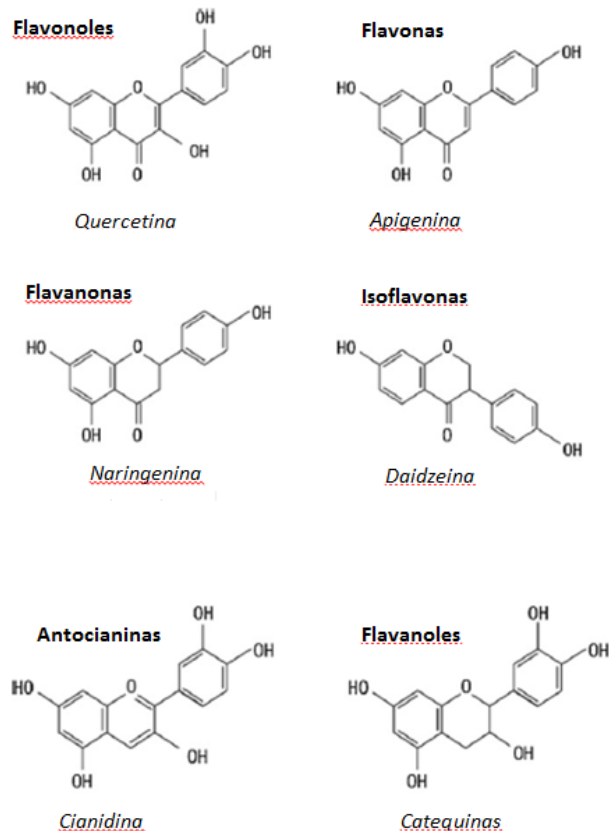
### **3.3.2 Flavonoides**

Los flavonoides son la clase de polifenoles de mayor distribución en los productos de origen vegetal. Cumplen funciones como agentes para repeler insectos y ciertos microorganismos, en la absorción de radicales libres y luz UV y en la atracción de simbioses benéficas y polinizadores (Liu *et al.* 2013). Son compuestos de bajo peso molecular, compuestos por 15 átomos de carbono en configuración base C6-C3-C6 (Figura 3). Su estructura consiste en dos anillos aromáticos, A y B, unidos por un puente de 3 carbonos en forma de un anillo heterocíclico (C), generalmente con presencia de un átomo de oxígeno. Las variaciones en este último anillo resultan en las diferentes clasificaciones de los flavonoides (Corradini *et al.*, 2011; Ignat *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Estructura base de los flavonoides.

Se clasifican, según el grado de hidroxilación y la presencia de dobles enlaces  $C_2-C_3$  en el anillo pirano heterocíclico, en: flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianidinas e isoflavonas como se muestra en la Figura 4 (Galanakis, 2018). Pueden existir en forma de aglicona o como sus conjugados glicosídicos. La glicosilación los hace menos reactivos, más polares y solubles en agua. En los flavonoides *O*-glicosídicos, uno o más de los grupos hidróxilo de la aglicona se une a un azúcar mediante un enlace *O*-C lábil al ácido, mientras que en los *C*-glucósidos se une al núcleo base mediante un enlace *C*-*C* resistente al ácido, caso menos común. La glucosa y galactosa son los azúcares más comúnmente unidos (Corradini *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Estructura química de los flavonoides (tomado de Ignat *et al.*, 2011).

Los flavonoles son flavonas unidas a un grupo hidroxilo en la posición 3 y la quercetina es de los cuatro flavonoles más comunes encontrados en frutas. Los flavan-3-oles (a veces referidos como flavanoles) se presentan en forma monomérica, oligomérica o polimérica conocidas como proantocianidinas. Los monómeros catequina y (-)-epicatequina son los flavanoles más comunes. La forma polimérica se conoce como taninos condensados, o proantocianidinas (Corradini *et al.*, 2011; Shahidi y Ambigaipalan, 2015).

### 3.3.2.1 Flavonoides en la CFC

De acuerdo con Sotelo *et al.* (2015), los flavonoides son el grupo de polifenoles más abundantes en la CFC, de los cuales los 3 grupos más comunes son las proantocianidinas (58%), las catequinas (37%) y las antocianinas (4%). Karim *et al.* (2014b) encontraron que la CFC presenta un contenido mayor de PFT y flavonoides en comparación a la cascarilla de los granos del cacao; además de una mayor capacidad antioxidante, evaluada según ensayos DPPH y FRAP. Al estudiar

el contenido de polifenoles en las fibras dietéticas obtenidas a partir de diferentes subproductos del cacao, Martínez *et al.* (2012) encontraron un contenido total entre 2,07-3,65 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g bs de muestra en la CFC, dependiendo de la localidad de cultivo y mezcla de solventes usada en su extracción. Se encontró que la CFC posee un mayor contenido de polifenoles en relación con los demás subproductos estudiados, la cáscara de los granos y el mucílago. Por otro lado, Rachmawaty *et al.* (2018) encontraron un contenido de polifenoles en el rango 49,92-94,92 mg EAG/g de extracto, al comparar dos solventes de extracción: una solución acuosa de acetona 70% y una de etanol 70 %. Además, realizaron un análisis cualitativo de los fitoquímicos en el extracto obtenido de la CFC en donde además de los flavonoides encontraron alcaloides, taninos, saponinas y triterpenoides.

Karim *et al.* (2014b), al analizar por cromatografía de gases acoplada a masas un extracto obtenido de la CFC, identificaron polifenoles, ácidos carboxílicos y azúcares. Entre los compuestos polifenólicos identificados mencionan ácidos fenólicos (protocatecuico, p-hidroxibenzóico y salicílico), flavonoles (kaempferol) y flavonas (linarina). En la identificación del perfil de compuestos fenólicos por HPLC, Valdez *et al.* (2017) encontraron que la quercetina, catequina y la (-)-epicatequina son los flavonoides más abundantes en la CFC; además, identificaron la presencia de los ácidos gálico, cumárico y protocatecuico en menores cantidades. La quercetina pertenece a la clase flavonoles; mientras que la catequina y la (-)-epicatequina pertenecen a la clase de flavan-3-oles.

### 3.3.3 Capacidad antioxidante

Un antioxidante es cualquier sustancia que, al estar presente en bajas concentraciones con respecto a un sustrato oxidable, retrasa o previene la oxidación de este sustrato. Un sustrato oxidable en presencia de oxígeno genera especies reactivas al oxígeno y radicales libres. Las especies oxidantes provocan daños acumulativos en proteínas, lípidos y ADN, moléculas fundamentales para el funcionamiento del organismo. Cuando se generan en exceso, producen un desequilibrio entre ellas y los antioxidantes resultando en estrés oxidativo; el cual está asociado a enfermedades y al proceso de envejecimiento celular (Sotelo *et al.*, 2015).

Los compuestos fenólicos poseen estructuras con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados, que les confiere actividad antioxidante al neutralizar los radicales libres, por donación de electrones o átomos de hidrógeno (Galanakis, 2018). Particularmente, los flavonoides actúan

como agentes reductores, donadores de oxígeno y quelantes del oxígeno libre, superóxido y de metales, lo que les confiere un alto potencial redox (Ignat *et al.*, 2011).

Para el estudio de capacidad antioxidante se utilizan los ensayos ABTS, DPPH, FRAP y ORAC, los cuáles se basan en la medición de la capacidad de un material derivado de plantas, de secuestrar radicales libres específicos. Estos ensayos se suelen combinar, ya que dadas sus diferencias, permiten obtener información más detallada en cuanto a las propiedades antioxidantes de la muestra (Martínez *et al.*, 2012).

### **3.3.4 Efecto de flavonoides en la salud**

La actividad fisiológica de los flavonoides se ha asociado con la reducción del estrés oxidativo, inhibición de la oxidación del colesterol LDL y de la agregación de plaquetas, vasodilatación de los glóbulos sanguíneos, inhibición de la adherencia de los monocitos al endotelio vascular, promoción de la fibrinólisis, acción inmunodepresora y antiinflamatoria e inhibición del proceso tumoral en diferentes fases (Lamuela *et al.*, 2005; Ignat *et al.* 2011).

Además, en estudios *in vivo* e *in vitro*, a los flavonoides se les ha reconocido actividad antiinflamatoria, antialérgica, hepatoprotectora, antitrombótica, antiviral y anticarcinogénica (Corradini *et al.*, 2011). También, algunos estudios han sugerido que los flavonoides ayudan a mantener la salud del sistema digestivo, ya que se les atribuye carácter antisecretorio y antidiarreico, una capacidad restauradora de la microbiota intestinal y preventiva de colitis por la actividad antibacteriana y antifúngica que desempeñan (Rahman, 2018). No obstante la información en relación a estos beneficios es contradictoria, por lo que es necesaria más investigación al respecto.

Actualmente, dado que se cuenta con suficiente evidencia científica para afirmarlo, la EFSA (European Food Safety Authority) a partir del 2014 permite la declaración, en bebidas de cacao y para chocolate oscuro, de que los flavanoles ayudan a mantener la elasticidad de los vasos sanguíneos, lo cual contribuye a un flujo sanguíneo, con una ingesta diaria de 200 mg de flavanoles de cacao.

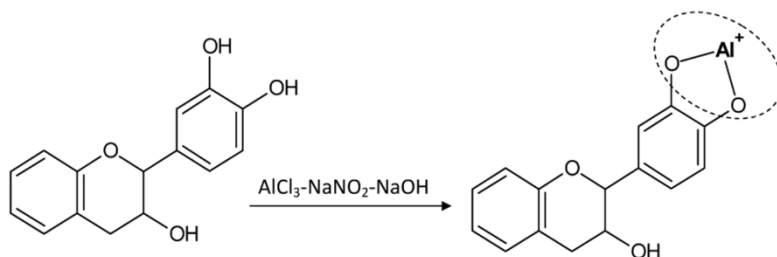
### **3.3.5 Métodos de análisis de flavonoides**

Históricamente, los flavonoides se han reportado dentro del contenido de PFT. Los PFT se pueden determinar espectrofotométricamente por absorción en la región ultravioleta visible (UV-

Vis), después de la reacción de la muestra con el reactivo Folin-Ciocalteu o con vainillina (Corradini *et al.*, 2011). Esta cuantificación presenta las ventajas de ser simple, de bajo costo y de dar resultados confiables. Sin embargo, este método espectrofotométrico no brinda información cuantitativa de los componentes individuales cuantificados, y es poco específico a la hora de caracterizar flavonoides, dada la extensa variedad de los PFT (flavonoides, ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, estilbenos, taninos y lignanos) presentes en las matrices y extractos vegetales (Ignat *et al.*, 2011). Para la cuantificación específica de compuestos flavonoides se utiliza la separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con detección UV o por espectrometría de masas (Corradini *et al.*, 2011), electroforesis capilar, cromatografía de fluido supercrítico, espectrofotometría de masas y cromatografía de gases (Ignat *et al.*, 2011; Galanakis *et al.*, 2018).

Para obtener el espectro en la región ultravioleta, de flavonoides sin la interferencia de otros compuestos fenólicos se utiliza la cuantificación espectrofotométrica con cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ). La determinación se realiza después de formar un complejo entre los flavonoides y el  $\text{AlCl}_3$ . Este método permite una estimación más específica de la mayoría de las agliconas por el efecto batocrómico e hipercrómico del complejo flavonoide-Al, así como una mayor representatividad y menores desviaciones (Ramos *et al.*, 2017).

Con este método se puede detectar flavonoles, flavanonas y principalmente flavanoles. La reacción utiliza nitrito de sodio e hidróxido de sodio para formar una coloración roja a la cual se le mide la absorbancia a una longitud de onda de 510 nm. La función del cloruro de aluminio es ceder el ion metálico del aluminio para la formación del complejo responsable de la coloración rojiza al estar en medio básico. El ion aluminio puede quelarse con el grupo o-dihroxilo (Figura 5), el cual produce una banda máxima de absorción a 510 nm (Ho *et al.*, 2012).



**Figura 5.** Formación del complejo cromogénico por quelación del ion aluminio con el grupo o-dihidroxilo de las catequinas (tomado de Ho *et al.*, 2012).

Los estándares más utilizados son catequina y rutina, en donde los resultados se expresan como g o mg del estándar por g de muestra seca o L de muestra. La principal limitación de este método es la selectividad por los flavonoides mencionados, por lo que el resultado no corresponde a los flavonoides totales. Además, si los flavonoides se encuentran glicosilados, se puede bloquear la formación del complejo con el cloruro de aluminio, obteniéndose un resultado menor al presente en la muestra (Galanakis *et al.*, 2018). Sin embargo, ha sido ampliamente usado en estudios previos de cuantificación de flavonoides en derivados del cacao (Ignat *et al.*, 2011; Karim *et al.*, 2014a; Valadez *et al.*, 2017). Por ser un método barato y fácil de implementar se considera adecuado para el establecimiento de las condiciones de extracción, dado que se adecua a los recursos disponibles del presente proyecto.

#### **3.4. Extracción de compuestos bioactivos de matrices vegetales**

Los compuestos o principios activos son aquellos compuestos químicos presentes en matrices vegetales a los que se atribuyen beneficios medicinales. Su contenido en las plantas suele ser bajo, lo que resulta en procesos de extracción extensos. La extracción es el proceso mediante el cual se separan compuestos de interés de una matriz (Zhang *et al.*, 2018). Para obtener un sustrato extraíble a partir de matrices vegetales, estas se procesan mediante operaciones básicas como lavado, secado, molienda, filtración, centrifugación, hidrólisis y digestión, dependiendo de la materia prima. El manejo adecuado durante estas etapas es fundamental para evitar pérdidas de los componentes de interés (Sasidharan *et al.*, 2010; Galanakis *et al.*, 2018).

Específicamente en la CFC se ha visto que los compuestos fenólicos que se pueden extraer dependen del pretratamiento al que se somete. El método de secado, la inmersión en soluciones acidificadas antes del secado y la fermentación afectan el contenido de polifenoles en la posterior extracción de acuerdo con la compilación de estudios de Campos *et al.* (2018).

Para la extracción de compuestos activos a partir de productos naturales la extracción con solventes es la más común. Esta extracción con solventes puede ser líquido-líquido o sólido-líquido, según el estado del sustrato del que se desea extraer. En la extracción sólido-líquido o lixiviación se produce un fenómeno de transferencia de masa de los compuestos de interés desde la matriz hacia el solvente. La eficiencia de la operación de extracción depende de factores como la temperatura, la relación soluto solvente (Rss), agitación, tamaño de partícula, tiempo de

contacto, tipo de solvente, concentración de ácido y número de extracciones (Ignat *et al.*, 2011; Ameer *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Watson, 2019).

Las técnicas de percolación, decocción, maceración, extracción con reflujo (método Soxhlet) se encuentran entre las técnicas de extracción sólido-líquido convencionales, y requieren grandes cantidades de solventes, en muchos casos contaminantes, y largos tiempos de extracción. Además, en la operación se presentan pérdidas por ionización, hidrólisis y oxidación, producto del calentamiento (Ignat *et al.*, 2011; Ameer *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018; Watson, 2019).

Dadas estas limitaciones de los métodos convencionales y a la naturaleza termolábil de los compuestos fenólicos, su extracción mediante un método eficiente y rápido sigue siendo un desafío. Las investigaciones más recientes, además han optado por alternativas “verdes” y efectivas en cuanto a reducir la cantidad de solvente, el tiempo y el consumo energético. La implementación de una tecnología verde a nivel industrial consiste en la optimización del consumo del sustrato, de la energía y del solvente utilizado (Ameer *et al.*, 2017; Watson, 2019).

#### **3.4.1 Extracción de flavonoides**

El procesamiento de la muestra para la extracción de flavonoides varía de acuerdo con la complejidad de la matriz en la que se encuentre, por lo que para cada sustrato en particular lo más apropiado es analizar las etapas necesarias. Las muestras sólidas se suelen someter a operaciones de limpieza, tratamientos térmicos suaves para la inactivación enzimática, molienda, homogenización y secado con aire caliente o por liofilización y, dependiendo de si se quieren obtener las agliconas, puede ser necesaria una hidrólisis (Corradini *et al.*, 2011).

En cuanto a la extracción propiamente, las extracciones sólido-líquido y líquido-líquido son las más comunes para compuestos fenólicos dada su facilidad, eficiencia y amplio rango de aplicación. Los alcoholes, acetona, éter dietílico, acetato de etilo o mezcla de solventes son utilizados como medio de extracción. Los factores como el pH, la temperatura, la Rss, número y tiempo de extracciones se consideran entre las variables más importantes de extracción.

#### **3.4.2 Variables de extracción**

##### **3.4.2.1 Tipo de solvente**

Para seleccionar los solventes de extracción se deben considerar factores tales como la selectividad y solubilidad de los compuestos a extraer, además del costo y seguridad de estos. Bajo

el principio de similitud e intermiscibilidad, *igual disuelve igual*, se busca seleccionar un solvente con una polaridad cercana a la del soluto. Generalmente, la extracción de flavonoides se realiza con solventes polares, como metanol o acetonitrilo acidificado en solución acuosa (Stalikas, 2007; Corradini *et al.*, 2011). Sin embargo, en la industria alimentaria se prefiere el uso de etanol dada la toxicidad del metanol (Ignat *et al.*, 2011).

Para la extracción de los compuestos fenólicos de la CFC se han utilizado diferentes solventes y sus mezclas. En estudios de extracción de compuestos fenólicos se ha visto que las mezclas de solventes son más efectivas. Por ejemplo, en un estudio realizado por Bochi *et al.* (2014) la extracción de antocianinas con una mezcla de acetona/agua (20:80) resultó ser más efectiva que los solventes individuales. Campos *et al.* (2018) mencionan el uso de metanol/acetona, etanol, acetona/agua y agua/etanol para la extracción de compuestos fenólicos a partir de la CFC. Particularmente, Martínez *et al.* (2012) lograron extraer una mayor cantidad de PFT de la CFC seca y molida así como una mayor capacidad antioxidante al usar la mezcla acetona/agua (70:30) (3,53- 3,65 mg EAG/g bs de cáscara) que al usar solo etanol (2,07 y 2,27 mg GAE/g); mientras que Sotelo *et al.* (2015) lograron extraer 0,25-0,35 mg de epicatequina/g bs de CFC al usar una mezcla de etanol/agua 50:50. A la vista de los resultados de estos estudios se considera que con una mezcla optimizada de acetona, etanol y agua se puede lograr una extracción eficiente de los flavonoides de la CFC.

#### **3.4.2.2 Relación sustrato solvente (Rss)**

La eficiencia de la operación de extracción se ve afectada mayormente por la Rss dado que el solvente extrae los compuestos de interés hasta que éste se satura (Bochi *et al.*, 2014). El volumen de solvente tiene que ser tal que sea suficiente para que todo el sustrato quede inmerso durante todo el proceso de extracción. Los valores de Rss comúnmente aplicados son entre 1:10 a 1:20 (Watson, 2019). Su optimización es importante por las implicaciones económicas y ambientales que representan: los costos de producción por la cantidad de solvente, energía necesaria para recuperar el solvente y volumen del equipo necesario. Al evaluar la variación de la Rss en la extracción de un pigmento a partir de la cáscara de la CFC, entre 1:5 hasta 1:20 (p/v), Nguyen (2015) reporta que esta variable tuvo un efecto significativo en el rendimiento de extracción.

### 3.4.2.3 Temperatura

Una variación en la temperatura de extracción afecta la permeabilidad de las paredes celulares, la solubilidad de los compuestos fenólicos y el fenómeno de transferencia de masa a través de la matriz vegetal. Generalmente, un aumento de la temperatura en el rango de 20 a 80 °C aumenta el rendimiento de extracción de polifenoles (Watson, 2019). Sin embargo, las altas temperaturas pueden ocasionar pérdidas del solvente y de compuestos termolábiles, con generación de impurezas, además que implica un mayor requerimiento energético (Zhang *et al.*, 2018). Nguyen (2015) evaluó el efecto de la variación de la temperatura de extracción entre 30-60°C para la obtención de compuestos fenólicos a partir de la CFC, en donde encontró que la mayor temperatura (60°C) se obtienen mayores rendimientos de extracción.

### 3.4.2.4 Concentración de ácido

Dependiendo del pKa de los compuestos así es su estado protonado o forma iónica, y por ende su solubilidad. Los grupos O-H de los polifenoles les aporta un carácter polar y dada esta polaridad son solubles en agua. El pKa de los compuesto fenólicos se encuentra entre 8-10 y se consideran ácidos muy débiles o bases fuertes. Por ello, que tienen a protonarse en medio ácido, lo cual los vuelve menos polares y más solubles en solventes menos polares que el agua (Soto, 2017).

Además, el potencial de hidrógeno (pH) del medio puede afectar la operación de extracción debido a que algunos compuestos fenólicos se encuentran unidos covalentemente a polisacáridos y a lignina. En soluciones ligeramente alcalinas o acidificadas se pueden romper estos enlaces y liberar los polifenoles (Watson, 2019). Además de esta hidrólisis, la variación en el pH puede provocar degradación de los compuestos de interés, y por esta razón resulta importante su optimización (Bochi *et al.*, 2014). Sotelo *et al.* (2015) evaluaron la extracción de PFT y epicatequina a partir de la CFC usando una proporción 1:1 de etanol y agua como solvente, con y sin adición de HCl al 1%. Se obtuvo un mayor contenido de PFT sin HCl, pero un mayor contenido de epicatequina al usar la concentración del 1% de HCl. De igual manera Hernández *et al.* (2018), obtuvieron un mayor contenido de epicatequina y catequina al utilizar la mezcla de metanol/agua acidificado hasta un pH de 3 cuando extrajeron diferentes compuestos fenólicos del grano de

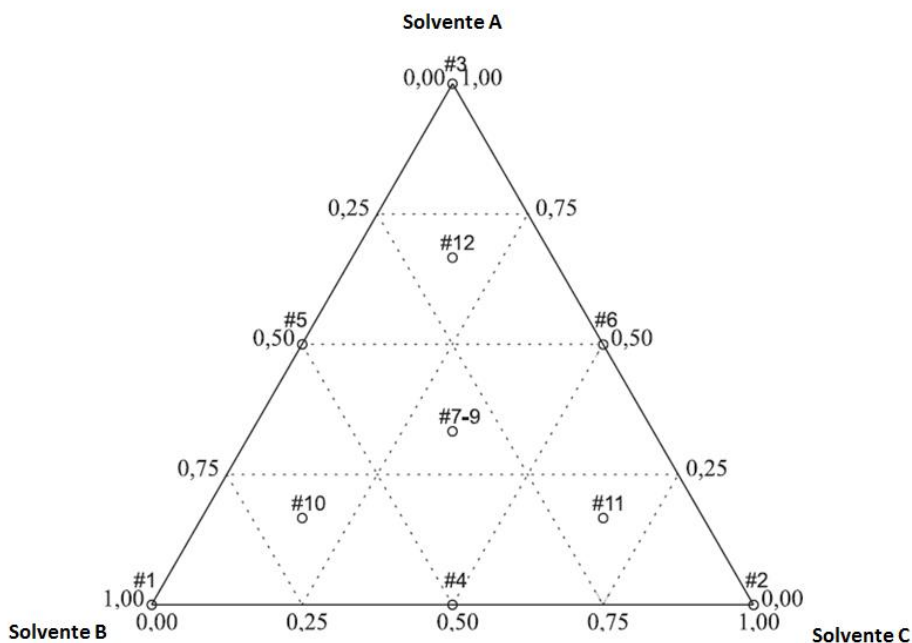
cacao y de la cáscara de este con diferentes combinaciones de etanol, metanol, agua, sin acidificar y acidificado con HCl.

### **3.5. Evaluación del proceso de extracción**

Tradicionalmente, la evaluación y optimización de la operación de extracción de compuestos fenólicos se ha realizado por medio del método de una variable a la vez. Sin embargo, esta técnica no muestra el efecto de la interacción entre las variables, a diferencia de la metodología de superficie de respuesta (MSR). Por ello, la aplicación del diseño experimental de MSR ha venido siendo más utilizada para optimizar la extracción de compuestos (Santos *et al.*, 2018).

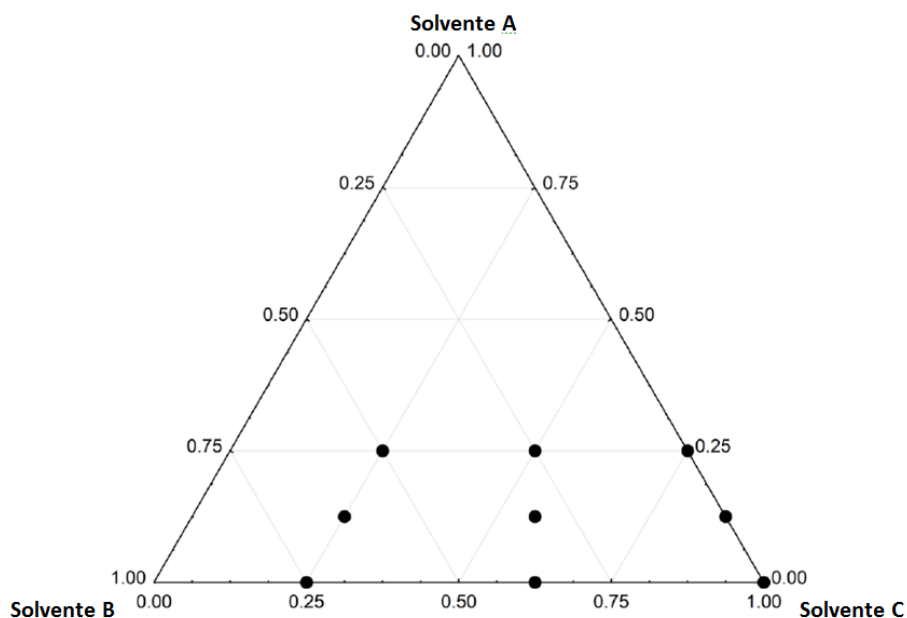
#### **3.5.1 Diseño experimental de mezclas**

Un diseño de mezclas es aquel en que los factores independientes son una proporción de los componentes de una mezcla, por lo que los diferentes factores suman el 100%. Se asume que la respuesta depende solamente de las proporciones relativas de los componentes de la mezcla y no de la cantidad de mezcla (NIST, 2012). Los diseños experimentales de mezclas más usados son los siguientes: red simple (*simplex-lattice*), centrado simple (*simplex-centroide*), vértices extremos y el diseño mixto. En un diseño simplex centroide de tres factores, cada uno de los componentes de la mezcla se representa en uno de los vértices de un triángulo en donde cada vértice representa al componente puro (100%). Los puntos medios laterales (# 4-6) representan una mezcla binaria de los componentes en una relación 1:1 y el punto central (# 7-9) una mezcla con proporciones iguales de cada componente (Figura 6) (Di Ciaula *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2015).



**Figura 6.** Región experimental de un diseño simplex centrado, utilizado para la optimización de los solventes de una extracción. Los números representan las mezclas de solventes a evaluadas. (tomado de Di Ciaula *et al.*, 2014).

El uso del diseño de vértices extremos o diseño de mezclas restringido se justifica cuando no es posible realizar los experimentos con una proporción del 100% de alguno de los componentes, porque los componentes de la mezcla están sujetos a ciertas restricciones como valores máximos o mínimos (NIST, 2012; Castro *et al.* 2017). En este caso la región experimental es un polígono irregular (Figura 7).



**Figura 7.** Región experimental de un diseño de mezclas restringido utilizado para la optimización de los solventes de una extracción (tomado de Castro *et al.*, 2017).

En este caso, se usan los vértices de la región restringida junto con puntos entre el centroide global y el centroide de la región experimental (Di Ciaula *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2015). Las restricciones de la Figura 7 corresponden a una proporción máxima de 0,25 del solvente A y una proporción mínima de 0,25 del solvente C.

El propósito del diseño de mezclas es modelar una superficie a partir de una ecuación matemática de regresión de tal forma que se pueda relacionar y predecir la respuesta de cualquier combinación de los componentes, o medir la influencia de cada componente individual en la variable respuesta (NIST, 2012).

Para determinar el efecto de los componentes de la mezcla sobre la respuesta es necesario ajustar los resultados a un modelo, el cual puede ser de primer, segundo o tercer orden, según el tipo de interacción que exista entre los términos del modelo. Los parámetros del modelo se estiman mediante el método de mínimos cuadrados y se selecciona el modelo en función de los parámetros estadísticos (Cornell, 2002). A continuación se presentan los diferentes modelos.

Lineal:

$$Y = \sum \beta_i x_i \text{ (ecuación 1)}$$

Cuadrático:

$$Y = \sum \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j \text{ (ecuación 2)}$$

Cúbico especial:

$$Y = \sum \beta_i x_i + \sum \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \sum \sum \sum_{i < j < k} \beta_{ijk} x_i x_j x_k \text{ (ecuación 3)}$$

En donde Y es la respuesta esperada,  $x$  los componentes de la mezcla y los parámetros  $\beta_i$  representan la respuesta esperada de una mezcla pura con  $x_j = 1$  y los demás componentes igual a cero. El término  $\sum \beta_i x_i$  es el término lineal de la mezcla. Si  $\beta_i x_i$  es positivo el término es sinergista, si es negativo antagonista. El término  $\beta_{ij}$  es el término cuadrático o de segundo orden y el  $\beta_{ijk}$  el término cúbico (Cornell, 2002).

### 3.5.2 Diseño central compuesto (DCC)

El DCC se utiliza para determinar los coeficientes de un polinomio de segundo orden (ecuación 4) y presenta la ventaja de reducir el número de experimentos cuando se estudia el efecto de varias variables al mismo tiempo, en relación con otros diseños experimentales (Montgomery, 2004), lo cual se traduce en el uso de menos recursos para el desarrollo del experimento.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \text{ (ecuación 4)}$$

Un DCC es un arreglo factorial con puntos centrales aumentado con un grupo de puntos axiales que permiten estimar una curvatura del modelo, por lo que está formado por puntos centrales, factoriales y axiales. La distancia desde el centro de espacio experimental hasta los puntos factoriales es de  $\pm 1$  unidades para cada factor y la distancia hasta los puntos axiales es de  $\alpha$ . El valor de  $\alpha$  y del número de puntos centrales depende de las propiedades deseadas para el diseño. La cantidad de puntos axiales siempre es del doble de la cantidad de factores del diseño. Para mantener la rotabilidad, el valor de  $\alpha$  depende del número de factores del diseño (ecuación 5) y de si el diseño consta de bloques. Para 3 variables corresponde a 1,68 (NIST, 2012).

$$\alpha = [2^k]^{1/4} \text{ (ecuación 5)}$$

Donde,

k: número de factores o variables independientes

El número de experimentos de un DCC está dado por la ecuación 6, a partir de la cual se obtienen 20 experimentos para 3 factores, para que sea de precisión uniforme y rotatable. Todos los factores se estudian en 5 niveles:  $-\alpha$ , -1, 0, +1,  $+\alpha$  (Bezerra *et al.*, 2008).

$$N = k^2 + 2k + c_p \quad (\text{ecuación 6})$$

Donde,

N: número de puntos experimentales

k: número de factores independientes

$c_p$ : número de puntos centrales= 6

Los resultados de este diseño experimental se analizan realizando una regresión para obtener un modelo y mediante la metodología de superficie de respuesta para obtener una ecuación modelo que describa la relación entre los factores estudiados y la variable respuesta.

### 3.5.3 Metodología de superficie de respuesta (MSR)

Los resultados del modelo que se obtiene se pueden optimizar mediante la técnica de la superficie de respuesta (Gómez *et al.*, 2015). La MSR consiste en un grupo de técnicas matemáticas y estadísticas que se basan en el ajuste de modelos empíricos a datos experimentales en relación con un diseño experimental. Se emplean funciones polinomiales, lineares o cuadráticas para describir el sistema en estudio y así modelar condiciones experimentales para su optimización. Para evaluar si el modelo se ajusta a los datos para describir el dominio experimental en estudio se aplica el análisis de varianza (ANDEVA), en donde el modelo de regresión se ajusta bien a los datos experimentales si presenta una probabilidad y regresión significativa y una falta de ajuste no significativa (Bezerra *et al.*, 2008). La regresión se considera significativa si el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{ajd}$ ) son mayores a 0,8, y si presenta una distribución de residuos aleatoria (Montgomery, 2004).

La validación del modelo de superficie que se obtiene se realiza seleccionando puntos dentro de la zona óptima de extracción, para realizar corridas experimentales en donde la variable respuesta obtenida debe de encontrarse dentro del intervalo de confianza del valor óptimo del modelo. Además, en los modelos cuadráticos se pueden obtener puntos críticos, máximos y

mínimos. La ecuación del modelo predicho se puede representar en la superficie de respuesta en dos o tres dimensiones, en donde la región óptima se puede visualizar (Bezerra *et al.*, 2008).

### **3.6. Caracterización de extractos vegetales**

Los extractos que se obtienen a partir de un material vegetal son siempre una mezcla de diversos compuestos fenólicos solubles y de sustancias no fenólicas en solución, tales como azúcares, ácidos, sales, ceras, terpenos y grasas. Para el presente estudio, donde es sustrato de extracción es la CFC, anteriormente se ha reportado que el extracto acuoso contiene 7,9% bs de cenizas y un 13% bs de azúcares solubles (Yapo *et al.*, 2013). Particularmente, en la extracción de flavonoides, es común que estos se encuentren en los tejidos vegetales en la forma glicosídica, al ser esta forma más soluble en agua (Corradini *et al.*, 2011), a excepción de los flavanoles que se suelen encontrar en la forma de aglicona, y al usar agua en la mezcla de solventes de extracción. Además, los flavonoides tienen la capacidad de quelar metales como el hierro y otros minerales esenciales (Corradini *et al.*, 2011). Así que al extraer estos compuestos existe la posibilidad de que estos minerales se arrastren al extracto.

La identificación de los compuestos presentes en el extracto resulta importante para la identificación de las operaciones o etapas necesarias para su purificación, según su propósito de aplicación (Cuevas *et al.*, 2017). Por ello, los análisis del contenido de sólidos totales, azúcares simples y cenizas resultan útiles para la caracterización del extracto. Respecto a sus características funcionales los análisis de PFT, flavonoides y capacidad antioxidante ORAC brindan información relevante en relación con la cantidad y actividad de estos compuestos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Localización

La preparación del sustrato de extracción a partir de la CFC se realizó en la Planta Piloto del Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA). Las corridas de extracción de flavonoides se efectuaron en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos, en tanto que, los análisis químicos de los extractos se realizaron en el Laboratorio de Química del CITA. Todos estos lugares están ubicados en la Sede Rodrigo Facio de la Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.

### 4.2 Materias prima

Para la preparación del sustrato de extracción a partir de la CFC se utilizaron frutos de cacao (*Theobroma cacao* L.), variedad trinitario del clon TSH 565 procedentes de la finca La Dorada, ubicada en Santa Rosa de Pocosol, cantón de San Carlos.

### 4.3 Metodología

#### 4.3.1 Evaluación de las condiciones de escaldado.

##### 4.3.1.1 Procedimiento

Los frutos de cacao se recibieron en la planta piloto, se lavaron con un cepillo y agua y se secaron, se partieron por la mitad y se les retiró la pulpa con sus semillas (cacao en baba) y la placenta del endocarpio. A las mitades de los frutos se les retiró el pericarpio con un cuchillo (ver Figura 1). Las cáscaras se escaldaron en una marmita (Groen, Estados Unidos), con agitación en una proporción líquido/cáscara 20:1 en masa. Se evaluó el efecto de la combinación de condiciones de tiempo, temperatura y concentración de ácido cítrico del agua de escaldado sobre la inactivación enzimática según las condiciones que se establecen en el Cuadro I.

**Cuadro I.** Condiciones de tiempo, temperatura y concentración de ácido cítrico evaluadas en el escaldado del pericarpio del fruto de cacao.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración de ácido cítrico (%)
A	80	5	0
B			1
C		10	0
D			1
E	90	5	0
F			1
G		10	0
H			1

Las condiciones evaluadas se establecieron con base en procedimientos realizados en investigaciones previas (Sotelo et al., 2015; Campos et al., 2018) y en pruebas preliminares. La efectividad del escaldado para inhibir la actividad enzimática se verificó cualitativamente con una prueba de ausencia presencia de oscurecimiento, adicionando una disolución de catecol al 1%, de acuerdo con la metodología descrita por Rivera (2015), quien evaluó la efectividad del escaldado para inactivar las enzimas presentes en la broza de café. Para esto, se retiró el pericarpio de la cáscara de 3 trozos con un pelador y se dividió en 2 partes. A una de ellas se le agregaron gotas de la disolución de catecol al 1%, mientras que a la otra no, para poder evaluar el cambio o no de coloración y compararla con un control sin escaldar al que también se le adicionó la solución de catecol. El catecol se considera un sustrato natural de la PFO, por lo que si se encuentra activa en el tejido vegetal, en presencia de oxígeno cataliza la oxidación del catecol. Producto de la oxidación del catecol se aprecia un pigmento oscuro en el tejido (Herrera *et al.*, 2003). Luego de pasados 10 minutos, se consideró que la actividad enzimática no se ha inhibido si las muestras con solución de catecol se oscurecían. Cada tratamiento se evaluó por triplicado

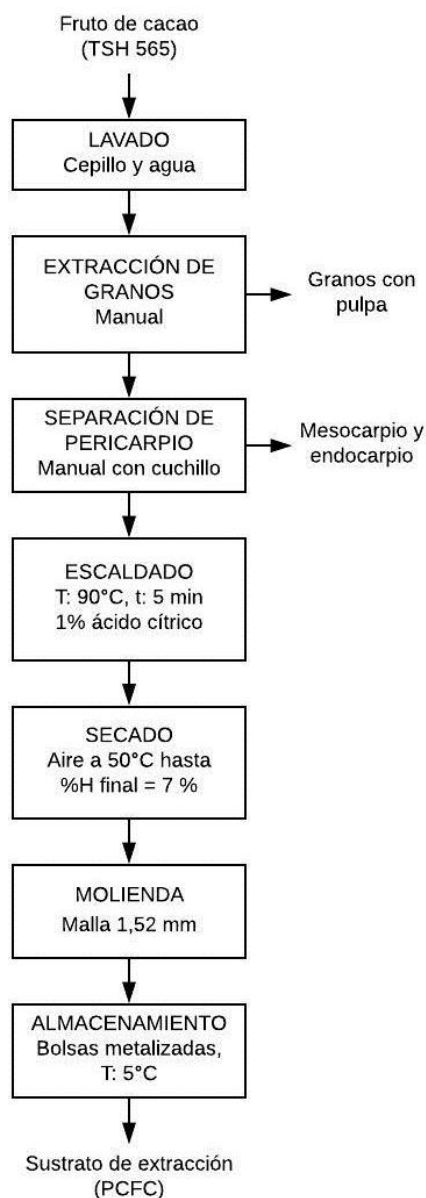
#### 4.3.1.2 Análisis de resultados

La ausencia o presencia del pardeamiento enzimático en la cáscara del cacao se determinó visualmente por lo que no se aplicó un análisis estadístico (Rivera, 2015). Se seleccionaron como las condiciones de escaldado más adecuadas, aquellas mínimas que indicaron inactividad enzimática.

### 4.3.2. Preparación del sustrato

#### 4.3.2.1 Procedimiento

Con base en metodologías empleadas en estudios previos para el procesamiento de las cáscaras del fruto de cacao (Martínez *et al.*, 2012; Sotelo *et al.*, 2015) y los resultados de la evaluación del escaldado se definió el procedimiento de preparación del sustrato que se detalla en la Figura 8.



**Figura 8.** Procedimiento de preparación del sustrato de extracción a partir del fruto de cacao.

Los frutos de cacao se lavaron con agua, se abrieron por la mitad y se les retiró las semillas con la pulpa (cacao en baba). A la cáscara de los frutos se les removió el pericarpio pelándolas con cuchillo y estos se escaldaron en una marmita de vapor (Groen, Estados Unidos) de acuerdo con las condiciones definidas anteriormente en el apartado 4.3.1. Una vez escaldado el pericarpio de las cáscaras se secaron a 50°C hasta un contenido de humedad del 7% en el secador de aire caliente (National, Estados Unidos). Al pericarpio de las cáscaras secas se les redujo el tamaño en un molino JT-6/1030 (Fitzmill, Canadá) con malla de retención de 1,54 mm, para obtener un producto con un tamaño menor a 1 mm. El producto seco y molido se almacenó en refrigeración a 4-5 °C en bolsas metalizadas, hasta su uso como sustrato en las etapas de extracción siguientes, por un tiempo máximo de 5 meses. Se refiere a este sustrato de extracción como pericarpio de la cáscara del fruto de cacao (PCFC).

#### **4.3.3 Validación del método de cuantificación de flavonoides.**

Para poder cuantificar el contenido de flavonoides en los extractos a obtener en los objetivos específicos 2.2.2 y 2.2.3 fue necesario validar el método de cuantificación a emplear. La determinación de flavonoides mediante el método de cloruro de aluminio, para el cual se detalla el procedimiento en apartado 4.3.6.6, se verificó la linealidad en el ámbito de trabajo, se determinaron los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), así como la precisión en términos de repetibilidad y reproducibilidad, mediante el método de mínimos cuadrados simples. La exactitud no se evaluó dado que no se obtiene un porcentaje de recuperación al estar validando un método de cuantificación y no un método de extracción. Además, no se puede obtener este porcentaje de recuperación al no haber un método de preparación de muestra previo.

##### ***Linealidad***

Las curvas de calibración permiten relacionar una respuesta analítica con la concentración de un determinado analito, en donde la señal respuesta es función de la concentración del analito (Skoog, 2016). En este caso la absorbancia es función de la concentración de flavonoides extraídos. Un coeficiente de determinación mayor a 0,99 entre la señal respuesta y la concentración evidencia un buen ajuste del método (AOAC, 2002). Para la cuantificación de los flavonoides se elaboraron 3 curvas de calibración con un patrón del compuesto (-)-epicatequina como estándar, dado que se reporta como uno de los flavonoides presentes en mayor proporción en la CFC

(Sotelo *et al.* 2015; Valadez *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2018). La concentración de (-)-epicatequina para realizar la curva varió entre 1,06-21,92 mg/L y se realizaron 10 puntos para cada curva.

A partir de los parámetros de regresión lineal se obtiene la ecuación que permite obtener la concentración flavonoides como equivalente de (-)-epicatequina (EE) en los extractos. Sin embargo, fue necesario realizar una curva de calibración cada vez que se realizó la cuantificación en los extractos, porque el cloruro de aluminio utilizado para la formación del complejo coloreado se tiene que preparar cada vez que se realiza la cuantificación dado que en el almacenamiento este reactivo forma un precipitado y cambia de color.

#### ***Ámbito de trabajo***

El ámbito de trabajo es una medida del alcance o aplicabilidad del método (AOAC, 2002). Se definió a partir de extractos de flavonoides obtenidos en pruebas preliminares y de acuerdo con el rango de absorbancia en el que se mantiene la linealidad, según la Ley de Beer-Lambert.

#### ***LD y LC***

Para establecer el LD se determinó la concentración mínima de analito que puede detectarse en el ámbito de trabajo, utilizando la ecuación 6 a partir de 30 datos experimentales. Mientras que para el LC la cantidad de analito en la muestra que puede ser cuantificada con determinado grado de confianza de acuerdo con la ecuación que se presente seguidamente (Skoog, 2016).

$$LD = \frac{3 \cdot S_b}{m} \quad (\text{ecuación 7})$$

$$LC = \frac{10 \cdot S_b}{m} \quad (\text{ecuación 8})$$

Donde,

$S_b$ : Desviación estándar del intercepto

$m$ : Pendiente de la recta

#### ***Precisión del método de análisis***

Para evaluar la precisión de repetibilidad del método, la desviación estándar (RSD por sus siglas en inglés) indica el error o diferencia máxima aceptada entre las mediciones para que se consideren confiables (Skoog, 2016). El RSD se obtuvo a partir de la concentración promedio obtenida en 3 muestras y aplicando la siguiente ecuación.

$$RSD = \frac{SD}{x} \quad (\text{ecuación 9})$$

Donde,

SD: Desviación estándar

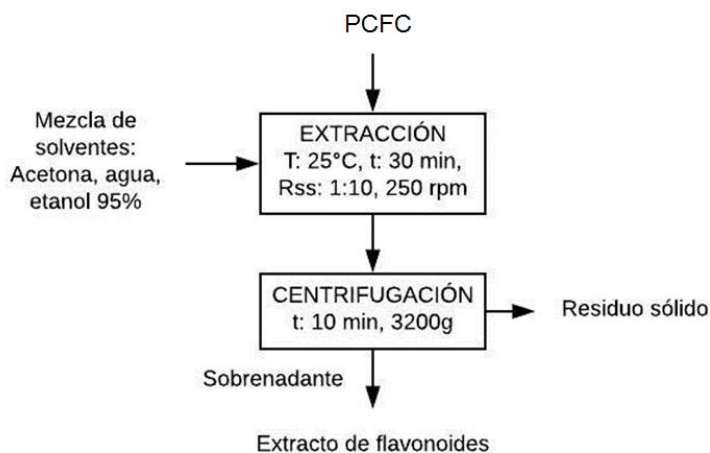
x: Promedio

La reproducibilidad es una medida de la máxima precisión esperada del método cuando se varían las condiciones del análisis. Su valor se obtuvo al realizar 3 repeticiones de la cuantificación en 3 días distintos, para un  $n=9$  y utilizando la ecuación 9.

#### 4.3.4. Evaluación del efecto de la combinación de solventes (acetona, agua, etanol 95%) en la extracción de los flavonoides.

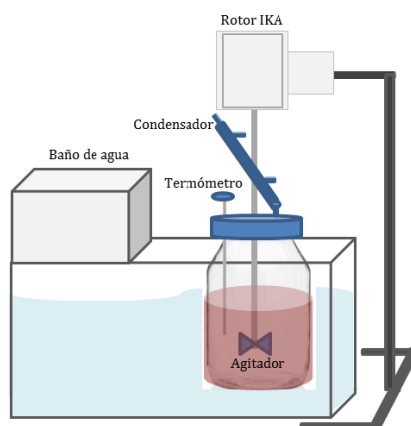
##### 4.3.4.1 Procedimiento de extracción

A continuación, en la Figura 9, se presenta el procedimiento y las condiciones para la obtención de los extractos de flavonoides a partir del sustrato obtenido.



**Figura 9.** Proceso de extracción de flavonoides a partir del sustrato obtenido del pericarpio del fruto de cacao para evaluación de mezcla óptima de solventes.

Para la extracción se utilizó el equipo que se muestra en la Figura 10. Éste consta de un recipiente que contiene el sustrato y la mezcla de solventes, el cual tiene acoplado un termómetro, un agitador y un condensador para controlar las condiciones de extracción. El sistema de agitación consta de un rotor Eurostar 60 (IKA®, Alemania), con propela de disco plano de 6 hojas (tipo Rushton) y un condensador metálico enfriado por agua con serpentín interno para aumentar el área de transferencia de calor. El baño de agua permite mantener la temperatura ambiente del sistema de extracción (Quirós, 2016).



**Figura 10.** Equipo de extracción utilizado para la obtención de flavonoides a partir del pericarpio del fruto de cacao (tomado de Quirós, 2016).

Como unidad experimental se utilizaron 40 g de sustrato, con una relación sustrato solvente 1:10 (Nguyen, 2015), a una temperatura promedio de 25°C, durante 30 minutos y con agitación de 250 rpm. Transcurridos los 30 minutos se centrifugó la mezcla en una centrífuga 5810R (Eppendorf™, Alemania) a 3200 g por 10 minutos, para separar el extracto líquido de los sólidos del sustrato. La fase líquida separada por decantación, se pesó, se vertió en un balón aforado de 500 mL y se aforó con agua destilada. Este extracto se almacenó en viales de 20 mL envueltos en papel aluminio en refrigeración (4-5 °C) hasta la cuantificación por duplicado de los flavonoides por un tiempo máximo de 2 semanas.

#### 4.3.4.2 Diseño experimental

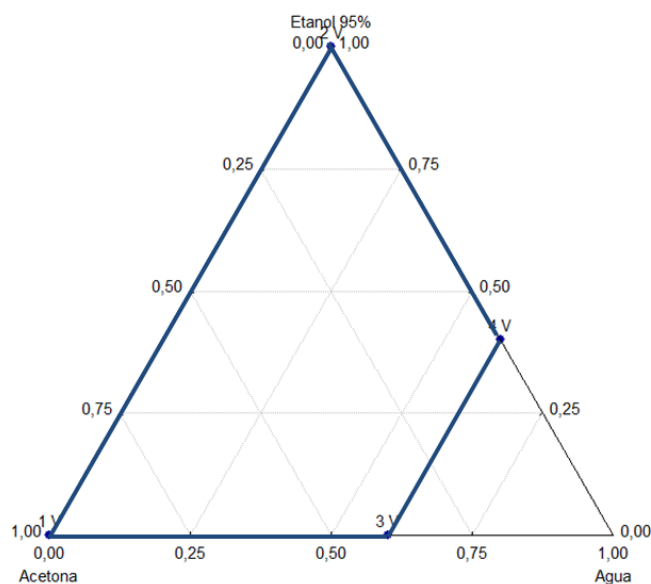
Para evaluar y optimizar la combinación de solventes que producen el mejor rendimiento de extracción de flavonoides del sustrato se utilizó un diseño de mezclas restringido debido a que el componente agua se puede usar en una proporción máxima de 60% para obtener un extracto de baja viscosidad que se pueda separar por centrifugación el líquido del residuo sólido.

Se evaluaron 3 factores que corresponden a la fracción (m/m) de los solventes acetona, agua y etanol 95% en 5 niveles: proporciones de 1,000; 0,667; 0,500; 0,333 y 0,167. La combinación de proporciones de los 3 factores resulta en 9 tratamientos, con tres repeticiones en el punto central (mezcla de los tres componentes en proporciones iguales) que se muestran en el

Cuadro II y la Figura 11, en donde el contenido de flavonoides expresados como mg EE/g extracto fue la variable respuesta, que se determinó por duplicado.

**Cuadro II.** Combinación de solventes a evaluar en la extracción de flavonoides del pericarpio del fruto de cacao.

Tratamiento	Etanol (g etanol 95%/g solvente)	Agua (g agua/g solvente)	Acetona (g acetona/g solvente)
1	1,00	0,00	0,00
2	0,00	0,00	1,00
3	0,40	0,60	0,00
4	0,00	0,60	0,40
5	0,00	0,30	0,70
6	0,50	0,00	0,50
7	0,70	0,30	0,00
8	0,20	0,60	0,20
9	0,35	0,30	0,35
10	0,35	0,30	0,35
11	0,35	0,30	0,35



**Figura 11.** Diseño de mezclas restringido utilizado para la optimización de los solventes de extracción de solventes.

Las 3 repeticiones en el punto central se emplearon para la estimación del error experimental (Di Ciaula *et al.*, 2014). Los datos obtenidos se analizaron por medio del Software Statistica 7 (Statsoft®, EUA), con un 95% de confianza.

#### 4.3.4.3 Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos se evaluaron mediante análisis de varianza el modelo, tres diferentes modelos de regresión: lineal, cuadrático y cúbico especial (ecuaciones 1 a 3), para seleccionar el que mejor se ajusta a los datos experimentales. A partir del modelo de mejor ajuste se generó su representación gráfica o superficie de respuesta utilizando el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, EUA). La evaluación del ajuste del modelo obtenido se realizó por medio de los parámetros estadísticos coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de determinación ajustado ( $R^2_{ajd}$ ), la probabilidad del modelo ( $p$ ) que debe ser significativa, la probabilidad de falta de ajuste ( $p_{fa}$ ) no significativa y la distribución de los residuos que se busca sea aleatoria. Para expresar la ecuación del modelo se utilizaron los coeficientes de los parámetros del modelo que resultaron significativos en el análisis de varianza. Para calcular las respuestas predichas por los modelos se utilizó en la ecuación matemática solo los coeficientes que resultaron significativos

( $p < 0,05$ ). Además, se realizó la optimización de los factores en la ecuación del modelo obtenido que permiten obtener la mayor concentración de flavonoides posible.

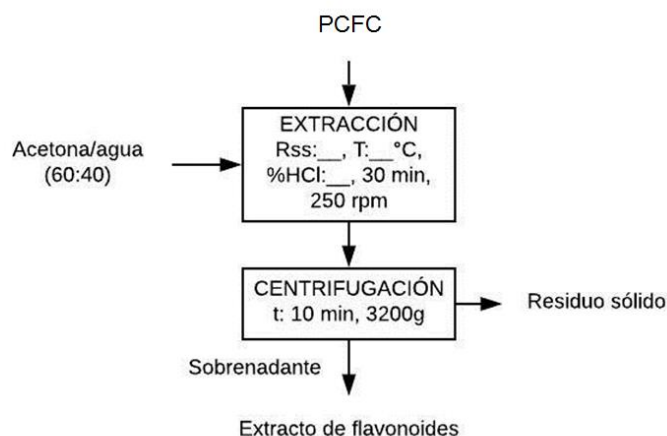
#### 4.3.4.4 Validación del modelo

Para validar que el modelo matemático obtenido de los resultados del diseño de mezclas es adecuado para predecir la variable respuesta, se realizaron 3 corridas adicionales de extracción de los flavonoides, bajo las condiciones definidas como las óptimas. Se verificó que el intervalo de confianza al 95% del valor predicho por el modelo se traslapara con el intervalo del valor obtenido experimentalmente de concentración de flavonoides.

#### 4.3.5. Evaluación del efecto de las condiciones de operación ( $R_{ss}$ , temperatura y concentración de ácido clorhídrico) sobre la extracción de flavonoides de la CFC.

##### 4.3.5.1 Procedimiento

El proceso de extracción utilizado se describe en la Figura 12. Se utilizó como solvente la mezcla óptima obtenida en el diseño de mezclas, acetona/agua 60:40. Se evaluó el efecto de las variables  $R_{ss}$ , temperatura y concentración de ácido clorhídrico 1 mol/L (Cn HCl) en el rendimiento de extracción de los flavonoides.



**Figura 12.** Proceso de extracción de flavonoides a partir del sustrato obtenido (PCFC) para evaluación del efecto de las condiciones de operación ( $R_{ss}$ , temperatura y Cn HCl).

El rango de las temperaturas evaluadas fue entre 22 y 48°C, las condiciones de  $R_{ss}$  en el rango 1:5 a 1:20, en tanto que la Cn HCl varió entre 0,001-0,02%. La operación de extracción se

realizó en el equipo que se detalla en la Figura 10. La centrifugación para separar los sólidos del extracto se realizó en centrífuga 5810R (Eppendorf™, Alemania) a 3200 g por 10 minutos. La fase líquida obtenida de la extracción se pesó y diluyó en un balón aforado de 500 mL con agua destilada. El extracto obtenido se almacenó en viales de 20,00 mL cubiertos con papel aluminio en refrigeración (4-5°C) por un máximo de 1 semana hasta la cuantificación de flavonoides, por duplicado para cada tratamiento, mediante el método descrito en la sección 4.3.6.6.

#### 4.3.5.2. Diseño experimental.

Para la evaluación del efecto de las variables  $R_{ss}$ , temperatura y Cn HCl sobre el rendimiento de extracción de flavonoides, se utilizó un diseño central compuesto (DCC) de 3 factores. Los niveles de cada factor se determinaron mediante pruebas preliminares y en información descrita en investigaciones previas. El diseño consta de 20 experimentos conformados por 8 puntos factoriales, 6 axiales y 6 corridas en el punto central como se muestra en el Cuadro III. Las corridas experimentales se realizaron de forma aleatoria.

**Cuadro III.** Niveles de factores a evaluar para la optimización de las condiciones de extracción de flavonoides.

Variable	Codificación				
	-1,68	-1,00	0	1,00	1,68
R <sub>ss</sub>	5,0	8,0	12,5	17,0	20,0
T (°C)	22,0	30,6	35,0	42,7	48,0
Cn HCl (%)	0,0001	0,0041	0,0100	0,0159	0,0200

En el Cuadro IV se detallan los tratamientos aplicados, correspondientes a las combinaciones de los niveles de las variables obtenidas a partir del DCC.

**Cuadro IV.** Descripción de tratamientos aplicados para la optimización de las condiciones de extracción de los flavonoides a partir del sustrato PCFC.

Tratamiento	Rss (g solvente/g sustrato)	Temperatura (°C)	Cn HCl (%)
1	8,00	30,55	0,0041
2	8,00	30,55	0,0159
3	8,00	42,70	0,0041
4	8,00	42,70	0,0159
5	17,00	30,55	0,0041
6	17,00	30,55	0,0159
7	17,00	42,70	0,0041
8	17,00	42,70	0,0159
9	5,00	35,00	0,0100
10	20,00	35,00	0,0100
11	12,50	22,00	0,0100
12	12,50	48,00	0,0100
13	12,50	35,00	0,0000
14	12,50	35,00	0,0200
15	12,50	35,00	0,0100
16	12,50	35,00	0,0100
17	12,50	35,00	0,0100
18	12,50	35,00	0,0100
19	12,50	35,00	0,0100
20	12,50	35,00	0,0100

#### 4.3.5.3 Análisis estadístico

A partir de las concentraciones de flavonoides que se obtuvieron en las corridas extracción del DCC se generó por regresión la ecuación del modelo cuadrático y sus respectivas superficies de respuesta utilizando el programa estadístico Statistica 7 (Statsoft®, USA). Para el análisis del modelo obtenido se determinaron el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el coeficiente de

determinación ajustado ( $R^2_{-ajd}$ ) que se recomienda sean mayores a 0,8, la probabilidad del modelo (p) que se espera sea significativa, la probabilidad de falta de ajuste ( $p_{fa}$ ) no significativa y la distribución de los residuos aleatoria. Para establecer la ecuación del modelo de segundo orden se utilizaron los coeficientes de los parámetros que resultaron ser significativos en el análisis de varianza con un nivel de significancia de 0,05.

#### 4.3.5.4 Validación del modelo cuadrático obtenido

Para validar que el modelo matemático obtenido de los resultados del DCC es adecuado para predecir la variable respuesta, se realizaron 3 corridas adicionales de extracción de los flavonoides, bajo las condiciones definidas como las óptimas (Rss: 1:16, T: 48°C y Cn HCl: 0,02%). Se verificó que el intervalo de confianza al 95 % del valor predicho por el modelo se traslapara con el intervalo del valor obtenido experimentalmente de la concentración de flavonoides.

#### 4.3.6. Caracterización de los componentes del extracto

##### 4.3.6.1 Contenido de sólidos totales.

El contenido de sólidos totales del extracto obtenido se determinó siguiendo el método de humedad de la AOAC 902.01 (AOAC, 2005). Para la determinación de humedad se utilizan cápsulas de metal con tapa que se secan de previo con 1 cucharadita de arena a 100°C por 1 hora en una estufa de convección. Se transfieren las cápsulas a un desecador y se dejan enfriar. Se pesan y se añaden 10 mL del extracto y se mezcla la muestra con la arena con un agitador de vidrio. Luego se procede a secar la muestra en la estufa de convección a 60°C con un vacío entre 50,8 y 84,6 kPa. Una vez seca la muestra se transfiere al desecador y se mide la masa cuando alcance la temperatura ambiente. Mediante la siguiente ecuación se obtiene el contenido de sólidos totales (AOAC, 2005).

$$\text{Sólidos totales} = \frac{MCMS - MC}{MCM - MC} * 100\% \quad (\text{ecuación 10})$$

Donde,

MCMS: masa de cápsula + masa muestra seca

MC: masa de cápsula

MCM: masa de cápsula + muestra

Esta determinación se realizó por triplicado y el resultado se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, usando un  $\alpha=0,05$ .

#### 4.3.6.2 Azúcares simples

El contenido de azúcares simples del extracto (sacarosa, glucosa, fructosa) obtenido se determinó por cromatografía líquida de alta resolución con detector de índice de refracción (HPLC-RID), en una columna cromatográfica Phenomenex Luna NH<sub>2</sub>, 5 μm, 250 mm x 4,6 mm y un detector de índice de refracción Shimadzu RID 10<sup>a</sup>. Para la determinación, se miden 10-20 g de muestra, se filtran con un microporo 0,45 μm, y se diluyen con agua según el contenido de sólidos solubles (°Brix) de la muestra. Se realiza una curva de calibración inyectando distintos volúmenes de la disolución madre en la columna de intercambio iónico con disoluciones de los azúcares a cuantificar. La fase móvil utilizada es agua grado HPLC, con un flujo de 0,4-0,5 mL/min, una temperatura horno/detector de 80°C/45°C, un volumen de inyección de 3 μL y una concentración de los estándares entre 0,05-1,0 g/100 g. El contenido de azúcares se obtiene con la ecuación 11.

$$g/100 \text{ g de muestra} = \frac{\left(\frac{g}{100 \text{ mL}}\right) \text{curva} * \text{volumen (mL)}}{\text{masa de muestra (g)}} * 100\% \quad (\text{ecuación 11})$$

Esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, usando un  $\alpha=0,05$ .

#### 4.3.6.3 Cenizas totales

Para la determinación del contenido de cenizas en el extracto obtenido se siguió el método basado en el método AOAC 950.14 para extractos de limón y naranja (AOAC, 2005). En un crisol previamente incinerado y enfriado a temperatura ambiente se pesan 5-10 g del extracto. La muestra se seca en la estufa de convección a 100°C para luego quemarla en un calentador en capilla. Se procede a incinerar la muestra a una temperatura mayor a 525°C en la mufla hasta obtener cenizas blancas y hasta masa constante. Se enfrían hasta temperatura ambiente en desecador, se mide la masa final y se obtiene el contenido de cenizas a partir de la siguiente ecuación.

$$\text{Cenizas totales } \left(\frac{g}{100g}\right) = \frac{MCMS-MC}{MCM-MC} * 100\% \quad (\text{ecuación 12})$$

Donde,

MCMS: masa de crisol + masa muestra incinerada

MC: masa de crisol

MCM: masa de crisol + muestra

Esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, un  $\alpha=0,05$ .

#### 4.3.6.4 pH

Para la determinación del pH en el extracto obtenido se siguió el método AOAC 981.12 para muestras líquidas (AOAC, 2005). La medición se realiza a temperatura ambiente (20-22°C), con un pHmetro calibrado, sumergiendo su electrodo en dos porciones de extracto diferentes. Esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, usando un  $\alpha=0,05$ .

#### 4.3.6.5 Polifenoles totales (PFT)

El contenido de PFT del extracto obtenido se determinó siguiendo el método P-SA-MQ-04, basado en el método de Georgé *et al.* (2005). En el cual la muestra reacciona con el reactivo Folin Ciocalteu y forma un complejo al que se le mide la absorbancia a 765 nm con un espectrofotómetro UV-Vis (Jasco V-630, Alemania). Para la cuantificación se preparó una curva de calibración con concentraciones de ácido gálico, por lo que el resultado se reporta como equivalentes de ácido gálico (EAG)/L. El resultado de este análisis se refiere a los polifenoles extraíbles (PFT). Esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, usando un  $\alpha=0,05$ .

#### 4.3.6.6 Contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó por duplicado para cada tratamiento, mediante el método espectrofotométrico descrito por Valadez y otros (2017) y validado en la sección 4.3.3. Se toma determinado volumen de la muestra de extracto y se diluye a 25,00 mL con agua destilada. Se toma 1,00 mL de esta dilución y se le adicionan 0,3 mL de  $\text{NaNO}_2$  al 5 % (p/v). Después de 5 minutos se adicionan 0,3 mL de  $\text{AlCl}_3$  al 10 % (p/v) y se deja reposar 6 minutos.

Posteriormente, se adicionan 2 mL de NaOH 1M y se afora hasta 10 mL con agua destilada. Se mide la absorbancia a 510 nm en espectrofotómetro UV-Vis (Jasco V-630, Alemania). Para la curva de calibración se usó como compuesto patrón (-)-epicatequina, por lo que los resultados se expresan como mg equivalentes de (-)-epicatequina (EE)/mL extracto en el caso del segundo objetivo y como mg EE/g bh de sustrato para el tercero.

Para la caracterización del extracto final, esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, usando un  $\alpha=0,05$ .

#### **4.3.6.7 Capacidad antioxidante ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)**

La determinación de la capacidad antioxidante del extracto (ORAC hidrofílico) se realizó siguiendo el método de Huang *et al.* (2002). Este método se basa en el seguimiento por espectrofotometría de fluorescencia de la cinética de reacción, en la que la muestra contrarresta el ataque de radicales libres a una disolución de fluoresceína. Como patrón antioxidante se utiliza una disolución Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) y la sustancia AAPH (2,20-Azo-bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro) como fuentes de radicales libres. La concentración en la muestra, reportada como  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalentes (TE)/L de muestra, se obtuvo por interpolación en la curva de área bajo la curva respecto a la concentración de Trolox. Esta determinación se realizó por triplicado y se reportó el promedio con el intervalo de confianza como incertidumbre, usando un  $\alpha=0,05$ .

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Condiciones de escaldado para la inactivación de las enzimas de deterioro de los polifenoles en el pericarpio de la cáscara del fruto de cacao (PCFC) a utilizar como sustrato de extracción.

Los resultados de la evaluación cualitativa de la inactivación de las enzimas oxidativas de los polifenoles se muestran en el Cuadro V.

**Cuadro V.** Resultado de la evaluación cualitativa de la actividad enzimática (ausencia/presencia) en el PCFC sometido a diferentes tratamientos de escaldado.<sup>1</sup>

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración de ácido cítrico (%)	Prueba de ausencia/presencia enzimática <sup>2</sup>
A	80	5	0	+
B			1	-
C		10	0	+
D			1	-
E	90	5	0	+
F			1	-
G		10	0	+
H			1	-

<sup>1</sup> En el Cuadro XVII, sección de Anexos se muestran las imágenes de las pruebas.

<sup>2</sup> +: presente, -: ausente

Como se puede observar en el cuadro anterior, tanto para ambas condiciones de tiempo (5 y 10 min) como de temperatura (80°C y 90°C) la actividad enzimática permanece actuando en el PCFC cuando no se adiciona ácido cítrico; por tanto, se evidencia el efecto de su presencia y se considera necesaria la adición de ácido cítrico al 1% en la solución de escaldado para la inactivación de las enzimas.

En cuanto a las condiciones de tiempo y temperatura de escaldado, Queiroz *et al.* (2008) mencionan que la inactivación de la PFO se logra entre 70-90°C, y que las condiciones de tiempo van a depender de la matriz. Al comparar los tratamientos catalogados con actividad ausente, el tratamiento que cumple con las condiciones mínimas parece ser el tratamiento B (5 min a 80°C).

Sin embargo, después de transcurridos los 10 min a los que se realizó la evaluación cualitativa, en las muestras sometidas a este tratamiento se presentó oscurecimiento. En los tratamientos D y F (10 min a 80°C y 5 min a 90°C, respectivamente) no se observó este oscurecimiento, por lo que se considera que en estos se evidencia mejor la ausencia de la actividad enzimática (Cuadro XVII). El primer tratamiento corresponde a las condiciones mínimas de temperatura, mientras que el segundo a las condiciones mínimas de tiempo. Se seleccionó el tratamiento F como el más adecuado para evitar la degradación térmica de los polifenoles al estar expuestos por un menor período de tiempo a las altas temperaturas, así como para evitar una mayor lixiviación de los compuestos de interés, asociada con mayores tiempos de escaldado. No obstante para poder verificar mediante cuál de estos dos tratamientos se da una menor degradación térmica de los polifenoles se podría cuantificar el contenido de polifenoles totales en la cáscara fresca y en las muestras sometidas a cada tratamiento.

Sotelo *et al.* (2015) utilizaron este mismo tiempo de escaldado y concentración de ácido cítrico a una temperatura menor (75°C) en la preparación de la CFC previo al secado. Sartini *et al.* (2017) obtuvieron un 24% más en el contenido de polifenoles totales y un 13% más en la cantidad de flavonoides al sumergir las cáscaras en una solución de ácido cítrico 1% por 15 minutos antes de secarlas. Sin embargo, estos autores no evaluaron el efecto de las diferentes condiciones de escaldado en la recuperación de los compuestos fenólicos, con lo cual se reduce la pérdida de estos compuestos durante el posterior procesamiento del sustrato de extracción, y por lo tanto, se puede lograr una mayor recuperación de los flavonoides al momento de su extracción de la CFC.

Por otro lado, también con el objetivo de maximizar la extracción de compuestos fenólicos de la CFC mediante la inactivación enzimática, Valadez *et al.* (2017) evaluaron diferentes métodos de secado (aire caliente, liofilización y microondas), en donde la aplicación de cualquiera de los 3 métodos resultó en un aumento en el contenido de los compuestos fenólicos a extraer en relación con los presentes en la cáscara fresca; sin embargo, no combinaron el secado con la operación de escaldado. Así que, se recomienda evaluar en conjunto el efecto de escaldado, con las condiciones obtenidas como las más adecuadas, seguido de un secado con aire para la inactivación de las enzimas relacionadas con la degradación de los compuestos y así lograr una mayor extracción de los flavonoides de la CFC. Preferiblemente la temperatura de secado debe ser menor a los 50°C para evitar la degradación de los compuestos de interés.

Finalmente, se evidencia como la operación de escaldado en solución ácida es efectiva al minimizar la acción enzimática durante el procesamiento del sustrato de extracción. Esto, resulta de gran importancia en la extracción de flavonoides de la CFC dado que las enzimas PFO y POX cumplen una función de deterioro considerable que afecta de forma negativa tanto la recuperación de compuestos fenólicos como la actividad antioxidante de los extractos que se obtienen de las matrices vegetales (Cuevas *et al.*, 2017).

En cuanto a la evaluación de la actividad de la enzima si se quisiera evaluar cuantitativamente su actividad se podría cuantificar el contenido de PFT antes y después de la aplicación de los tratamientos. Si el contenido de PFT disminuye después de aplicar el tratamiento, la pérdida se podría deber a la actividad de la enzima o a la severidad del tratamiento.

## 5.2. Validación del método de cuantificación de flavonoides

Se presentan los resultados obtenidos en los parámetros evaluados para la validación del método de cuantificación de flavonoides con cloruro de aluminio.

### **Linealidad**

En el Cuadro VI se muestran los parámetros de regresión lineal obtenidos para la determinación de la ecuación empleada para la cuantificación de flavonoides como equivalentes de (-)-epicatequina (EE) en el ámbito de trabajo definido.

**Cuadro VI.** Parámetros de la ecuación de regresión lineal para la cuantificación de flavonoides como equivalentes de (-)-epicatequina.

Parámetro	Valor
R <sup>2</sup>	0,996
Pendiente	0,0393
Desviación estándar pendiente	0,0013
Intercepto	0,005
Desviación estándar intercepto	0,016

El coeficiente de determinación obtenido muestra una buena correlación de linealidad entre la absorbancia del extracto a una longitud de onda de 510 nm y la concentración equivalentes de (-)-epicatequina en disolución. A partir de los parámetros anteriores se obtuvo la

ecuación 13 que permite obtener la concentración de flavonoides como EE en los extractos. Las curvas de calibración realizadas al cuantificar flavonoides en días distintos se encuentran en el Cuadro XIII en la sección de Anexos.

$$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs_{510nm}^{-0,005}}{0,0393} \quad (\text{ecuación 13})$$

### **Ámbito de trabajo**

Se definió como ámbito de trabajo concentraciones de (-)-epicatequina entre 4,09 mg/L y 21 mg/L. El límite inferior corresponde al LC y el límite superior a la concentración correspondiente a una absorbancia de 0,826.

### **LD y LC**

En el Cuadro VII se muestran los límites obtenidos para el método de cuantificación de flavonoides empleado.

**Cuadro VII.** LD y LQ del método de cuantificación de flavonoides evaluado.

Límite	Valor (mg <sub>EE</sub> /L)
LD	1,23
LC	4,09

### **Precisión del método de análisis**

En el Cuadro VIII se muestran los valores de los parámetros utilizados para evaluar la precisión del método de cuantificación de flavonoides con cloruro de aluminio.

**Cuadro VIII.** Parámetros de precisión obtenidos para el método de cuantificación de flavonoides evaluado.

Parámetro	RSD (%)
Repetibilidad	10,00
Reproducibilidad	19,55

En la evaluación se obtuvo un RSD de 5,66 %, pero como se analizan varios extractos, dada la variabilidad de su naturaleza, se seleccionó una diferencia de máximo un 10% entre réplicas para que las mediciones se consideren confiables.

A partir de las características de confianza obtenidas en la validación del método de cuantificación de flavonoides por medio del método de cloruro de aluminio, se considera que el método resultó ser efectivo para relacionar la intensidad de la señal espectrofotométrica que se obtiene con el contenido de flavonoides como equivalentes de (-)-epicatequina en los extractos obtenidos a partir del PCFC.

### 5.3 Evaluación de la combinación de solventes (acetona, agua y etanol 95%) para obtener el extracto con la mayor concentración de flavonoides, mediante un diseño experimental de mezclas restringido.

En los extractos obtenidos de las corridas del diseño de mezclas restringido se obtuvieron las concentraciones de flavonoides que se muestran en el Cuadro IX.

**Cuadro IX.** Concentración promedio de flavonoides en extractos obtenidos mediante un diseño de mezclas restringido.

Tratamiento	Proporción de solventes (g solvente/g mezcla)			Concentración promedio <sup>1</sup> de flavonoides en extracto (mg EE/g extracto)
	Acetona	Agua	Etanol	
1	1,00	0,00	0,00	0,100 ± 0,000
2	0,00	0,00	1,00	0,651 ± 0,073
3	0,40	0,60	0,00	1,621 ± 0,004
4	0,00	0,60	0,40	1,808 ± 0,030
5	0,00	0,30	0,70	1,644 ± 0,035
6	0,50	0,00	0,50	0,528 ± 0,047
7	0,70	0,30	0,00	2,522 ± 0,073
8	0,20	0,60	0,20	1,880 ± 0,004
9	0,35	0,30	0,35	2,096 ± 0,065
10	0,35	0,30	0,35	2,233 ± 0,112
11	0,35	0,30	0,35	2,233 ± 0,026

<sup>1</sup> Para n=2. Intervalo de confianza con  $\alpha=0,05$ .

### 5.3.1 Selección del modelo de regresión

Para la selección del modelo de regresión que mejor se ajusta a las condiciones experimentales se evaluaron las probabilidades del modelo ( $p$ ), los coeficientes de determinación ( $R^2$ ), coeficientes de determinación ajustados ( $R^2_{ajd}$ ), probabilidad de falta de ajuste ( $p_{fa}$ ) y distribución de residuos que se muestran en el Cuadro X.

**Cuadro X.** Parámetros de evaluación para la selección del modelo de mejor ajuste<sup>1</sup>.

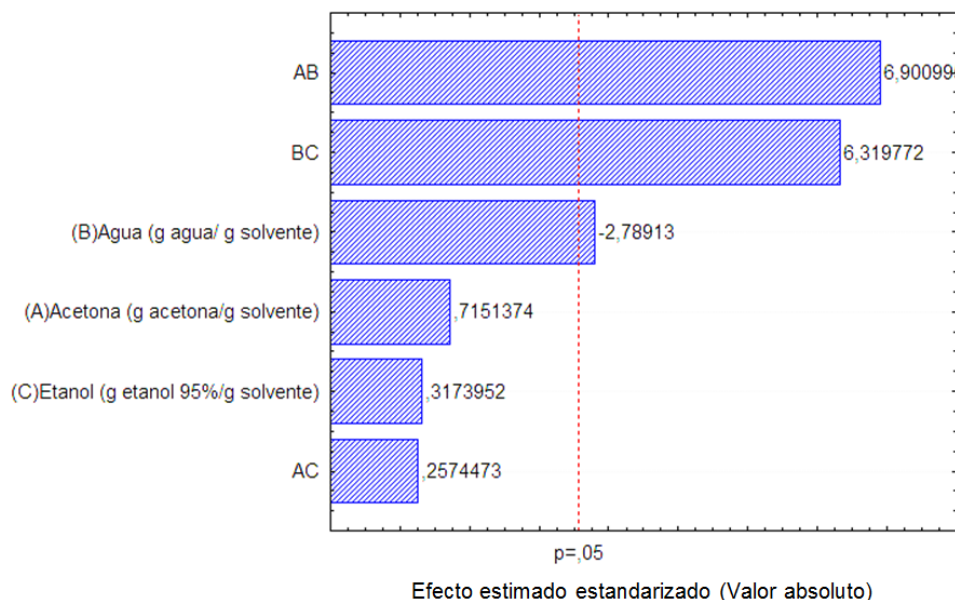
Modelo	P	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>ajd</sub>	p <sub>fa</sub>	Distribución de residuos
Lineal	0,0723	0,4814	0,3518	0,008	Aleatoria
Cuadrático	0,0042	0,9557	0,9114	0,048	Aleatoria
Cúbico especial	0,6233	0,9586	0,8966	0,035	Aleatoria

<sup>1</sup> En el Cuadro XIX de Anexos se encuentran los respectivos análisis de varianza completos.

El modelo de regresión que mejor se ajusta a los resultados experimentales, es aquel que sea significativo, que tenga los valores  $R^2$  y  $R^2_{ajd}$  mayores a 0,8, una  $p_{fa}$  no significativa y que presente una distribución de residuos aleatoria. Cuando más de un modelo presenta  $R^2$  mayores a 0,8 se selecciona el de mayores valores (Montgomery, 2004). Dado que el modelo cuadrático presenta una  $p$  significativa ( $p < 0,005$ ), valores  $R^2$  y  $R^2_{ajd}$  mayores a 0,80, se considera que es el modelo que mejor describe el comportamiento de extracción de flavonoides, en relación con la mezcla de solventes utilizados.

### 5.3.2 Ecuación del modelo de regresión y la superficie de respuesta obtenidos

En el modelo de regresión cuadrático obtenido, los factores que resultaron ser significativos fueron el factor agua, la interacción agua/acetona y la interacción agua/ etanol 95% como se aprecia en el diagrama de Pareto de la Figura 13.



**Figura 13.** Diagrama de Pareto para la estimación del efecto de los solventes en la extracción de flavonoides del PCFC en el modelo obtenido.

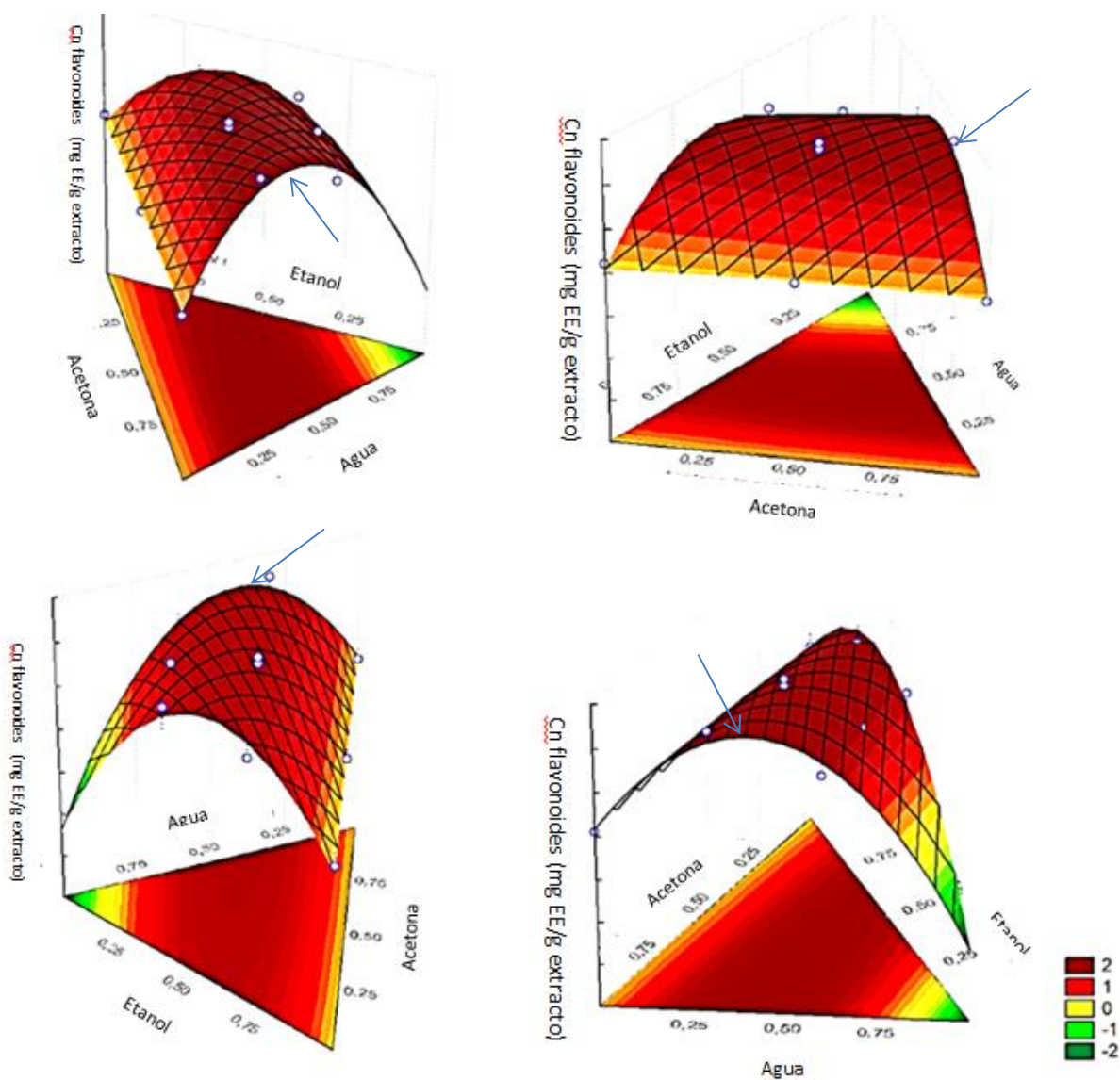
La ecuación del modelo obtenido se muestra a continuación. Los valores p para cada coeficiente se muestran en la sección de Anexos, Cuadro XX.

$$Cn \text{ flavonoides } \left( \frac{mgEE}{g \text{ extracto}} \right) = -2,33(Agua) + 13,4 (Agua * acetona) + 12,27 (Agua * etanol 95\%)$$

(ecuación 14)

Los coeficientes obtenidos para cada factor indican el peso de su influencia en la concentración de flavonoides extraídos del PCFC. Como se puede observar, tanto en el diagrama de Pareto como en la ecuación del modelo, la interacción agua-acetona es la que tiene un mayor efecto en la extracción de flavonoides, seguida por la interacción de agua-etanol, mientras que el factor proporción agua tiene un efecto negativo en la extracción. Los solventes acetona y etanol (A y C) puros no ejercen un efecto significativo en la concentración de flavonoides del extracto.

La Figura 14 corresponde a la superficie de respuesta del modelo obtenido y muestra el comportamiento de la extracción de los flavonoides en función de los solventes usados para su extracción.



**Figura 14.** Superficies de respuesta de los solventes estudiados para la extracción de flavonoides del PCFC (escala de colores indica mg EE/g de extracto). Las flechas en azul indican las zonas de máxima extracción.

Las zonas rojas más oscuras de la superficie representan las zonas donde se obtiene una mayor extracción de flavonoides. Se puede apreciar cómo en los vértices correspondientes a los solventes puros, es en donde se extraen las menores concentraciones, especialmente al usar agua pura, lo cual coincide con el efecto negativo del coeficiente agua en la ecuación del modelo.

La mayor extracción se da en la zona de la mezcla de solventes agua-acetona o agua-etanol. En la Figura 14 se puede apreciar como al estar ausente el agua, sin importar las proporciones entre etanol y acetona, se presenta una zona de baja extracción y se logran mayores concentraciones de flavonoides al aumentar la proporción de agua hasta un máximo de 0,60. Este efecto sinergista del agua tanto con el etanol 95% como con la acetona se refleja también en los términos significativos del modelo. Pero la zona de mayor extracción corresponde a una mezcla entre sólo acetona y agua, como se señala en la Figura 14.

El índice de polaridad del solvente es clave en la extracción de biocompuestos (Valadez *et al.*, 2017). El metanol y sus mezclas acuosas y acidificadas, han demostrado ser el solvente más efectivo para la extracción de flavonoides, con una polaridad relativa de 0,762; sin embargo, tiene una alta toxicidad (Ignat *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2018). Entre los solventes usados el etanol es el que tiene una polaridad relativa similar de 0,654. Sin embargo, la presencia de etanol en la mezcla no fue tan efectiva como las mezclas agua-acetona para la extracción de flavonoides. No obstante, si se quisiera usar etanol en la mezcla de solventes, en una proporción entre 0,55-0,60 con agua o en una proporción menor a 0,20 en combinación con los otros dos solventes también podría lograr un buen rendimiento de extracción, un poco menor al máximo. La polaridad relativa de la acetona es baja (0,355) y del agua alta (1,000), por lo que con la combinación de ambos se logró una polaridad intermedia, a la que posiblemente presentan una mejor afinidad los flavonoides, los cuales tienen un carácter relativamente polar (Corradini *et al.*, 2011).

Por otro lado, Yapó *et al.* (2013) explican que el etanol extrae mejor compuestos fenólicos de bajo peso molecular como las proantocianidinas oligoméricas, mientras que las poliméricas, como los taninos condensados se extraen mejor en soluciones acuosas de acetona 60-70%. Además, según Cuevas *et al.* (2017) en la CFC suelen predominar los compuestos fenólicos poliméricos, por lo que probablemente, dentro de los flavonoides extraídos existe una proporción importante de proantocianidinas poliméricas.

### **5.3.3 Optimización de mezcla de solventes para extracción de flavonoides**

A partir del modelo de regresión y su superficie de respuesta se obtuvo que una mezcla con una proporción 40:60 agua/acetona es la que produce una máxima concentración de flavonoides en el extracto ( $2,30 \pm 0,35$  mg EE/ g extracto) como se aprecia en la Figura 14. Este

resultado concuerda con lo planteado en la ecuación del modelo, en donde la interacción agua/acetona es la que tiene un mayor efecto en la extracción del compuesto de interés.

La mezcla de solventes obtenida que optimiza la extracción de flavonoides confirma los resultados obtenidos en estudios previos de extracción de polifenoles de diferentes subproductos del cacao, donde se analizó el tipo de solvente con el que se logra una mayor extracción, reportándose que las mezclas de solventes (metanol/acetona (Martínez *et al.*, 2012), etanol/acetona (Hernández *et al.*, 2019), metanol/agua (Hernández *et al.*, 2018) y acetona/agua (Rachmawaty *et al.*, 2018) demuestran ser más efectivas que los solventes puros (Campos *et al.*, 2018). Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se confirma específicamente que una mezcla de solventes es más efectiva para extraer los flavonoides de la CFC, que los solventes individuales.

Al comparar la extracción de compuestos fenólicos de la CFC utilizando una solución acuosa de acetona 70% y otra de etanol 70%, Rachmawaty *et al.* (2018) obtuvieron mayores contenidos de compuestos fenólicos al usar la mezcla de acetona/agua. De acuerdo con estos autores, los puentes de hidrógeno entre los átomos de oxígeno de la acetona y el átomo de hidrógeno de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos favorecen la solubilidad de los flavonoides, y por tanto, se facilita su extracción. Aunado a esto, la proporción entre los solventes de la mezcla también afecta la solubilidad. Al usar mayores proporciones de agua se favorece la interacción de puentes de hidrógeno entre el agua y la acetona que los puentes de hidrógeno entre los compuestos fenólicos y la acetona (Rachmawaty *et al.*, 2018); de manera que a mayores proporciones de agua se desfavorece la extracción de los compuestos de interés.

#### 5.3.4 Validación del modelo

La validación del modelo se realizó utilizando la mezcla de solventes que maximiza la concentración de flavonoides en el extracto. El valor predicho por el modelo y el obtenido en las corridas de verificación se muestran en el Cuadro XI.

**Cuadro XI.** Concentración de flavonoides predicha con un nivel de confianza del 95% por el modelo de mezcla óptima de solventes y lograda en corridas de verificación.

Valor	Concentración de flavonoides (mg <sub>EE</sub> /g extracto) <sup>1</sup>
Predicho por el modelo	2,30 ± 0,35
Obtenido en corridas de verificación	2,58 ± 0,10

<sup>1</sup> Para n=3

Como se aprecia, la concentración de flavonoides obtenida en las corridas de validación se traslapa con el intervalo de confianza del 95% del valor predicho por el modelo. Por tanto, el modelo generado predice adecuadamente la concentración de flavonoides que se obtienen de la extracción con la mezcla de los solventes estudiados, con un nivel de confianza del 95%.

#### 5.4 Evaluación de las condiciones de extracción (Rss, temperatura y Cn HCl) de flavonoides mediante un DCC.

En el Cuadro XII se muestra la concentración de flavonoides obtenida con los diferentes tratamientos generados mediante un DCC al utilizar la mezcla de solventes óptima, según los resultados obtenidos anteriormente.

**Cuadro XII.** Concentración de flavonoides obtenida al variar las condiciones Rss, temperatura y Cn HCl en extracción a partir del PCFC.

Tratamiento	Rss (g sustrato/ g solvente)	Temperatura (°C)	Cn HCl (% m/m)	Concentración promedio de flavonoides (mg EE/g sustrato) <sup>1</sup>
1	1:8,0	30,5	0,0041	16,72 ± 0,20
2	1:8,0	30,5	0,0159	12,74 ± 0,39
3	1:8,0	42,7	0,0041	14,01 ± 0,14
4	1:8,0	42,7	0,0159	19,33 ± 0,47
5	1:17,0	30,5	0,0041	20,48 ± 0,59
6	1:17,0	30,5	0,0159	17,07 ± 0,09
7	1:17,0	42,7	0,0041	25,05 ± 2,09
8	1:17,0	42,7	0,0159	23,71 ± 2,05
9	1:5,0	35,0	0,0100	11,72 ± 1,31
10	1:20,0	35,0	0,0100	18,57 ± 1,74
11	1:12,5	22,0	0,0100	18,24 ± 0,59
12	1:12,5	48,0	0,0100	21,13 ± 0,25
13	1:12,5	35,0	0,0000	18,86 ± 1,46
14	1:12,5	35,0	0,0200	22,66 ± 1,88
15	1:12,5	35,0	0,0100	20,73 ± 1,71
16	1:12,5	35,0	0,0100	23,57 ± 2,28
17	1:12,5	35,0	0,0100	22,44 ± 2,15
18	1:12,5	35,0	0,0100	22,10 ± 2,15
19	1:12,5	35,0	0,0100	22,97 ± 0,80
20	1:12,5	35,0	0,0100	21,03 ± 0,76

<sup>1</sup> Para n=2. Intervalo de confianza con  $\alpha=0,05$ .

#### 5.4.1 Modelo de regresión y superficie de respuesta obtenidos del DCC

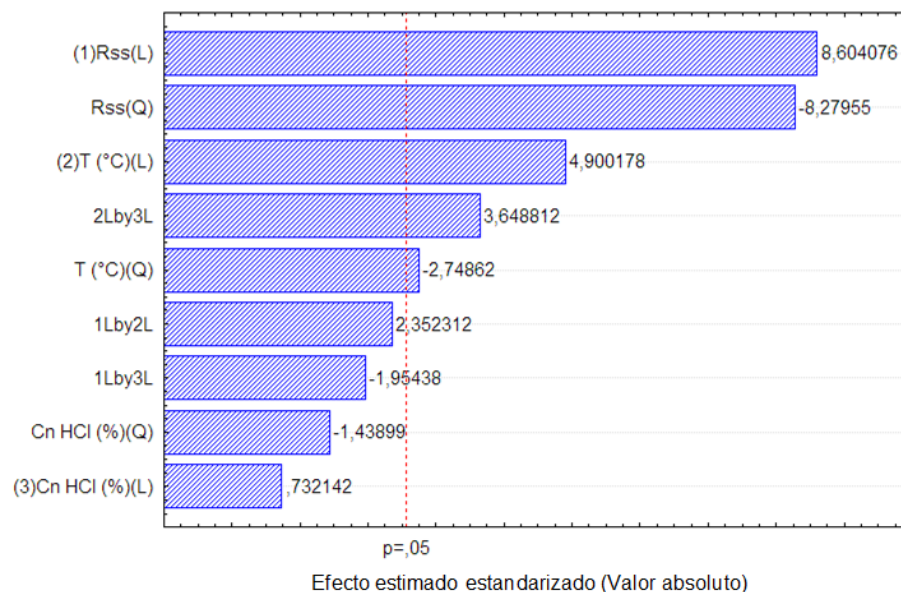
A partir de los resultados de la concentración promedio de flavonoides obtenida para los tratamientos con el DCC se generó un modelo cuadrático que relaciona dicha respuesta con las condiciones de extracción evaluadas. Los parámetros del modelo obtenido se muestran a continuación en el Cuadro XIII.

**Cuadro XIII.** Parámetros estadísticos del modelo cuadrático de condiciones de extracción de flavonoides a partir del PCFC.<sup>1</sup>

Parámetro	Valor
P	0,001
R <sup>2</sup>	0,8966
R <sup>2</sup> <sub>ajd</sub>	0,8036
p <sub>fa</sub>	0,0982
Distribución de residuos	Aleatoria

<sup>1</sup> En el Cuadro XXI de Anexos se encuentran el análisis de varianza completo del modelo.

El modelo obtenido se ajusta adecuadamente a las condiciones experimentales dado que la probabilidad es significativa ( $p < 0,005$ ), los estadísticos  $R^2$  y  $R^2_{ajd}$  son mayores a 0,8, presenta una  $p_{fa}$  no significativa y una distribución de residuos aleatoria (Montgomery, 2004). Por tanto, se considera que el modelo describe el comportamiento de extracción de flavonoides, en función de las condiciones de extracción de Rss, temperatura y Cn HCl. Los factores que resultaron ser significativos para la extracción de flavonoides a partir del PCFC se muestran en el siguiente diagrama de Pareto de la Figura 15.



**Figura 15.** Diagrama de Pareto del efecto de las variables de extracción de flavonoides del PCFC.

A partir de los factores significativos, se obtuvo la siguiente ecuación del modelo que describe la extracción de flavonoides. Los parámetros en la ecuación son los valores codificados. Los valores p correspondiente a cada coeficiente se muestran en el Cuadro XXII en la sección Anexos.

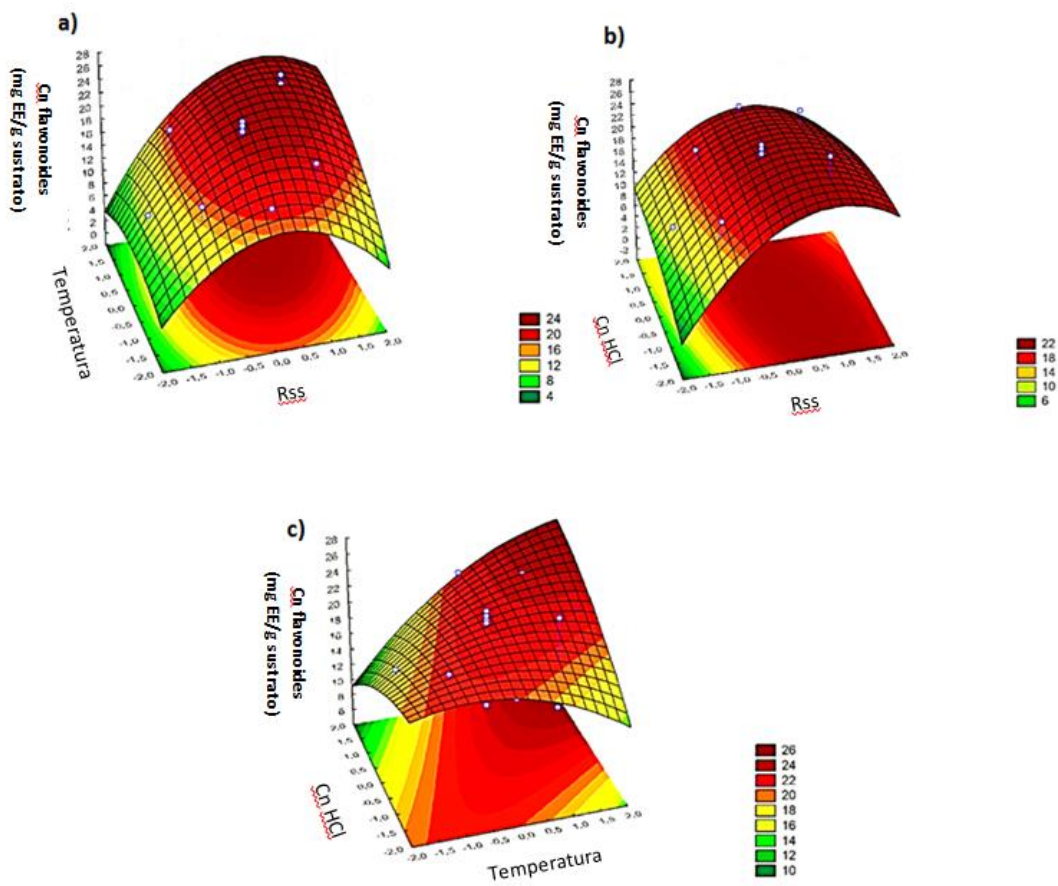
$$Cn \text{ flavonoides} \left( \frac{mg_{EE}}{g_{sust}} \right) = 21,78 + 2,57 Rss + 1,46 T - 2,41 Rss^2 - 0,80 T^2 + 1,42 T * CnHCl$$

(ecuación 15)

En el diagrama de Pareto y en la ecuación del modelo obtenido, se puede apreciar como los factores lineal y cuadrático, tanto de la Rss como de la temperatura muestran un efecto significativo en la extracción de flavonoides. Los factores lineales de temperatura y Rss tienen un efecto positivo, mientras que los cuadráticos de estas mismas variables tienen un efecto negativo. Además, la única interacción que tuvo un efecto significativo y positivo es la de temperatura con Cn HCl. Dado que los coeficientes son proporcionales al efecto, el efecto lineal y cuadrático de la Rss y el lineal de la temperatura son los que más afectan la concentración de flavonoides a obtener.

En la Figura 16 se muestran las superficies de respuesta que describen el comportamiento de la extracción de los flavonoides en función de las condiciones de extracción evaluadas. Las

regiones de color rojo oscuro representan una máxima extracción y las verdes son de mínima extracción.



**Figura 16.** Superficie de respuesta de las condiciones de extracción estudiadas para la extracción de flavonoides del PCFC (escala de colores indica mg EE/g de sustrato). Las variables se representan codificadas.

En la superficie de respuesta 16a se aprecia cómo a valores bajos de la Rss la extracción de flavonoides es baja y es poco afectada por la temperatura, pero conforme aumenta la Rss aumenta la concentración de flavonoides, que se ve incrementada a las mayores temperaturas de extracción. La Rss a la que se logra una mayor extracción de los flavonoides (0,0-1,5 variable codificada) corresponden a una Rss entre 1:12,5 a 1:19. Esta mayor extracción se logra indiferentemente de la concentración de ácido, como se observa en la Figura 16b. Por lo general, un aumento de la Rss aumenta los rendimientos de extracción de compuestos fenólicos (Cuevas *et*

*al.*, 2017). En las superficies obtenidas se logra observar este efecto, en donde las menores concentraciones de flavonoides se obtienen en las menores Rss. Lo anterior se debe a que al haber más solvente disponible, éste tiene mayor capacidad de extraer el soluto por el efecto de un mayor gradiente de concentración entre el sustrato y el solvente. De la misma manera, si esta relación es muy alta se agota el soluto a extraer, lo que ocurre probablemente a Rss mayores a 1:19. Además, a mayores Rss se da un efecto de dilución del compuesto de interés al estar en un mayor volumen (Cuevas *et al.*, 2017), por lo que se requiere concentrar el extracto, preferiblemente bajo condiciones suaves para evitar la degradación de los flavonoides.

En las figuras 16a y 16c se observa cómo al aumentar la temperatura de su valor bajo a 35°C (0 en variable codificada) se logra mayores extracciones, especialmente a valores altos de Cn de HCl, siendo 42,7°C (1,5 variable codificada) la temperatura a la cual se logra la máxima extracción. De acuerdo con Cuevas *et al.* (2017), la extracción a altas temperaturas mejora la eficiencia de extracción debido a que aumenta la permeabilidad de las paredes celulares, la solubilidad y coeficientes de difusión de los polifenoles, disminuye la viscosidad del solvente y se reduce la tensión superficial entre el solvente y la matriz sólida, y además se favorecen las reacciones de hidrólisis y de ruptura de complejos formados entre los polifenoles y otros compuestos. Un aumento en la temperatura provoca el aumento del movimiento de solutos y reduce la fuerza de los puentes de hidrógeno disminuyendo la energía necesaria para romper las interacciones matriz-soluto. Por ello, se esperaba que la mayor extracción de los flavonoides se lograra a las mayores temperaturas, lo que coincide con lo mostrado por las superficies obtenidas.

Respecto a la posibilidad de pérdidas de compuestos termolábiles, la degradación térmica de los flavonoides debido a epimerización, oxidación o polimerización se ha evidenciado a partir de los 60°C (De Taeye *et al.*, 2014), aunque esto depende de la matriz en que se encuentren. A temperaturas de 35°C se han reportado pérdidas de estos compuestos pero en tiempos de almacenamiento de 7 días (Mrmosanin *et al.*, 2015). En extractos derivados de productos de cacao se ha visto que temperaturas superiores a los 50°C disminuyen la actividad antioxidante del extracto obtenido (Cuevas *et al.*, 2017). Por efecto de las altas temperaturas, se pueden presentar pérdidas de solvente, por lo que para evitar estas pérdidas y la degradación de los compuestos de interés junto con la disminución de la actividad antioxidante del extracto, se recomienda extraer a la temperatura más baja a partir de la cual se logran las mayores extracciones: alrededor de 43°C

(1,5 en variable codificada). Para asegurarse de que a esta temperatura no se están degradando flavonoides se podría hacer un perfil de los compuestos presentes en el extracto.

En la Figura 16c se aprecia como una mayor extracción de flavonoides por efecto de utilizar temperaturas altas se debe también al efecto de emplear mayores concentraciones de ácido. Se puede observar ya que a concentraciones menores a 0,0071% (-0,5 en variable codificada), las extracciones son bajas sin importar la temperatura. De igual manera a las temperaturas más bajas, la extracción es reducida sin importar que la Cn HCl sea alta. Esta interacción también se puede apreciar en que la interacción temperatura-Cn HCl es un factor significativo de la ecuación del modelo, indicando un efecto sinérgico.

El efecto de esta interacción se puede deber a tres factores: primero, a que en medio ácido y a mayores temperaturas, como ya se explicó anteriormente, los polifenoles son más solubles; segundo, generalmente los compuestos fenólicos se encuentran en las matrices vegetales unidos covalentemente a polisacáridos, proteínas y lignina, por lo que en soluciones acidificadas se pueden romper estos enlaces y liberar los polifenoles, facilitando así su extracción (Watson, 2019), efecto que también se promueve con el aumento de la temperatura. Por último, en condiciones ácidas las proantocinidinas se hidrolizan en mezclas de monómeros y dímeros de epicatequina, y este compuesto es el utilizado para cuantificar los flavonoides del extracto (Spencer *et al.*, 2000). Esta hidrólisis ocurre en condiciones de acidez severas, por lo que a la Cn HCl usada no es probable que se de este efecto. Sin embargo, para poder identificar si los EE corresponden a epicatequina extraída de la PCFC o si provienen de esta hidrólisis se recomienda la identificación de los monómeros, oligómeros y polímeros de los flavonoides en el extracto de forma diferenciada mediante un análisis por HPLC-DAD, de preferencia acoplado a espectrometría de masas.

El resultado obtenido es congruente con los obtenidos en extracciones previas de flavonoides a partir de la CFC, en donde los mayores rendimientos se lograron al acidificar el medio de extracción. Sotelo *et al.* (2015) lograron extraer un mayor contenido de epicatequina al usar la concentración del 1% de HCl, en tanto que, Hernández *et al.* (2018), obtuvieron un mayor contenido de epicatequina y catequina al utilizar la mezcla de metanol/agua acidificado a pH de 3 al extraer diferentes compuestos fenólicos del grano de cacao y de la cáscara.

Dado que las mayores extracciones se lograron la mayor concentración de ácido, es posible que a concentraciones mayores a las evaluadas se logren mayores concentraciones de flavonoides en el extracto. Por lo que se recomienda evaluar el efecto de usar concentraciones mayores. Además si se quisiera usar otro tipo de ácido se podría evaluar el efecto de acidificar el solvente con ácido cítrico o ácido acético en lugar de ácido clorhídrico, verificando la proporción de uso que genere el mismo o un mayor rendimiento de extracción ya que estos ácidos se reconocen como seguros para su uso en alimentos.

#### 5.4.2 Optimización de las condiciones óptimas de extracción de flavonoides

Al optimizar las condiciones de extracción a partir del modelo de regresión, se obtienen los valores que se muestran en el Cuadro XIV, para cada una de las variables estudiadas.

**Cuadro XIV.** Condiciones óptimas de extracción de flavonoides del PCFC predichas por la superficie de respuesta del modelo cuadrático obtenido.

Factor del modelo	Valor óptimo
Rss	1:16
T (°C)	48
Cn HCl (%)	0,02

#### 5.4.3 Validación del modelo

En el Cuadro XV, se presenta la concentración de flavonoides obtenida al extraer por triplicado, bajo las condiciones óptimas indicadas por el modelo en el Cuadro XIV, junto con el valor predicho por el modelo.

**Cuadro XV.** Comparación entre la concentración de flavonoides predicha por el modelo y la obtenida en las corridas de verificación, bajo las condiciones óptimas de extracción.

Valor	Concentración de flavonoides (mg <sub>EE</sub> /g sustrato)
Predicho por el modelo ( $\alpha=0,05$ )	26,20 $\pm$ 4,65
Predicho por el modelo ( $\alpha=0,01$ )	26,20 $\pm$ 5,45
Obtenido en corridas de validación ( $\alpha=0,05$ )	20,48 $\pm$ 0,90 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Para n=3,  $\alpha$ : nivel de significancia

Como se aprecia, para un nivel de confianza del 95% los intervalos de la concentración de flavonoides de las corridas de validación y la predicha por el modelo no se traslapan, por lo que el modelo generado no logra predecir el comportamiento de la extracción de flavonoides del PCFC, dado que reporta valores mayores para la concentración de flavonoides que los obtenidos experimentalmente. Sin embargo, si se disminuye el nivel de significancia de 0,05 a 0,01 al rango de valores predichos del modelo los intervalos de confianza si se traslapan. Por tanto, el modelo obtenido predice la extracción de flavonoides del PCFC con un nivel de confianza del 99%.

### 5.5 Caracterización fisicoquímica del extracto de flavonoides obtenido del PCFC.

A continuación, en el Cuadro XVI se presentan los resultados de los análisis de azúcares simples, sólidos totales, cenizas, PFT, concentración de flavonoides, actividad antioxidante H-ORAC y pH realizados para tener la caracterización del extracto de flavonoides obtenido bajo las condiciones de extracción óptimas.

**Cuadro XVI.** Análisis fisicoquímicos para caracterización del extracto de flavonoides del PCFC.

Análisis	Resultado <sup>1</sup>
Azúcares simples (fructosa y sacarosa) (g/100g)	0,27 ± 0,02
Sólidos totales (g/100 g)	2,0 ± 0,3
Cenizas (g/100g)	0,097 ± 0,006
Polifenoles totales (PFT) (mg EAG/g bs)	321 ± 20
Flavonoides (mg EE/g bs)	20,48 ± 0,90
H-ORAC (μmol TE/g bs)	2318 ± 113
pH	4,02 ± 0,01

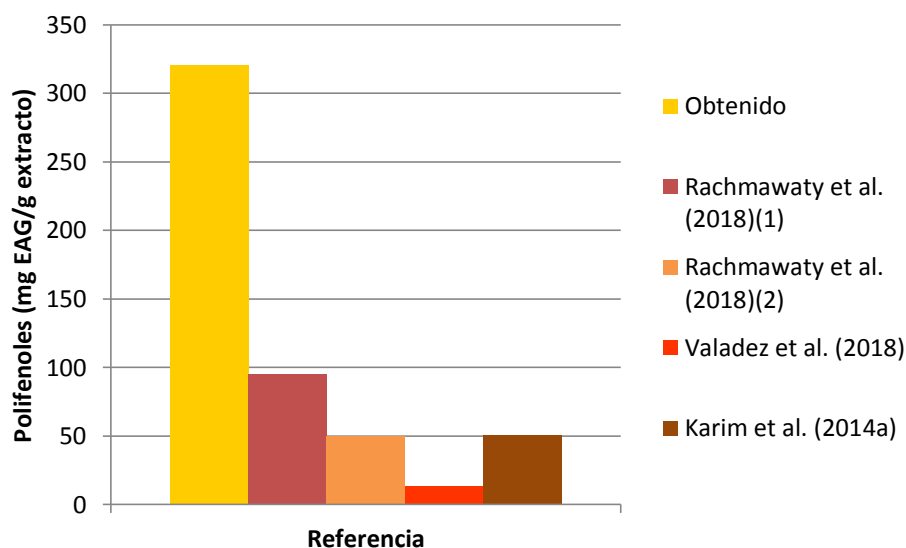
<sup>1</sup> Promedio para n=3. La incertidumbre expresada con el intervalo de confianza del 95%.

El contenido tanto de azúcares simples como de cenizas y sólidos totales en el extracto obtenido es relativamente bajo, en conjunto aportan aproximadamente una cuarta parte del contenido de sólidos totales. El contenido de azúcares en el extracto indica que están presentes glucósidos simples y posiblemente otras sustancias de carácter polar diferentes a los flavonoides; consideradas impurezas cuando se busca obtener un extracto de un compuesto bioactivo. Por ello, el contenido de azúcares y cenizas en el extracto obtenido indica un bajo contenido de impurezas. Si se quisiera purificar más el extracto, dada la sensibilidad de los compuestos de interés al calor,

se recomienda la técnica de adsorción o partición en columna cromatográfica (Ignat *et al.*, 2011; Cuevas *et al.*, 2017; Watson, 2019).

El bajo contenido de sólidos totales indica un alto contenido de solvente (98%), el cual puede afectar la estabilidad del extracto, dado que los compuestos fenólicos son más inestables al estar en solución acuosa que cuando se almacenan secos. Por tanto, se recomienda remover el solvente por concentración al vacío antes de su purificación.

En cuanto al contenido de PFT es importante mencionar que este valor puede estar sobrestimado, dado que en el método de análisis empleado otras sustancias no fenólicas reductoras pueden reaccionar y ser cuantificadas, como proteínas, tioles, derivados de vitaminas y iones inorgánicos como  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{I}^-$  y  $\text{SO}_3^{-2}$  (Everette *et al.*, 2010; Cuevas *et al.*, 2017). Sin embargo, resulta útil para comparar con extracciones previas. En la Figura 15 se muestran los PFT encontrados en la literatura para extractos de la CFC.



**Figura 17.** Contenido de PFT reportados en estudios previos de la extracción a partir de la CFC.

<sup>1</sup>Usando acetona/agua (70:30) como solvente de extracción.

<sup>2</sup> Usando etanol como solvente de extracción.

El contenido de PFT para el extracto obtenido (320,5 mg EAG/g extracto bs) es mayor a todos los valores reportados en investigaciones similares. Esta diferencia se puede atribuir a diferencias que van desde la variedad del fruto, hasta el procedimiento de extracción. En estas investigaciones se utilizó la cáscara del fruto completa y no solo el pericarpio, el método de extracción de Valadez *et al.* 2018 fue utilizando  $\text{CO}_2$  supercrítico como solvente de extracción;

Rachmawaty *et al.* (2018) (2) y Karim *et al.* (2014a) emplearon etanol. Solamente Rachmawaty *et al.* (2018) (1) utilizó un solvente similar (70:30 acetona/agua). En los estudios de estos autores se elimina el solvente para obtener un extracto seco, a diferencia del obtenido en el presente trabajo, lo cual influye directamente en la estabilidad y concentración de compuestos fenólicos, lo cual reafirma la necesidad de la recomendación planteada anteriormente de remover el solvente del extracto y secarlo.

De acuerdo con el contenido de PFT obtenido para el PCFC (119,15 mg EAG/g sustrato) y al obtenido previo a la investigación en el PCFC liofilizado (153,19 mg EAG/g de PCFC) se logró recuperar cerca de un 77% de PFT en el extracto, el cual se considera un buen rendimiento. Si se quisiera mejorar el rendimiento de extracción se le podría realizar más extracciones sucesivas al residuo sólido.

Respecto al contenido de flavonoides, a pesar de que la extracción realizada por Valadez *et al.* (2017) fue por mayor tiempo (60 min) y con más agitación (400rpm) a la utilizada en este estudio y analizados por el mismo método, los autores obtuvieron un contenido de flavonoides totales mucho menor, entre 2,91-6,01 mg EE/g ms. En comparación con el contenido de flavonoides del extracto obtenido ( $20,5 \pm 0,9$  mg EE/g sustrato) se logró extraer al menos 3 veces más de estos compuestos. En el proceso de extracción realizado por Valadez *et al.* (2017) no se aplicó un tratamiento de escaldado a la CFC ni se optimizaron las condiciones de extracción (Rss, temperatura y Cn HCl). A pesar de que las condiciones de extracción utilizadas fueron diferentes a las empleadas en el presente estudio, se empleó como solvente de extracción acetona-agua-ácido acético (proporción 70:29,5:0.5) similar al solvente óptimo de este estudio. Por tanto, se puede decir que en el presente trabajo se logró obtener un método de extracción de flavonoides más eficiente.

Por otro lado, en el extracto obtenido por Valadez *et al.* (2017) de CFC secada con aire caliente (mismo proceso al utilizado en el presente trabajo), se cuantificaron los flavonoides presentes por HPLC-DAD y se obtuvieron contenidos de  $867,9 \pm 28,7$ ;  $190,3 \pm 1,2$  y  $1589,5 \pm 54,4$   $\mu\text{g/g}$  de catequina, quercetina y (-)-epicatequina, respectivamente. Dada la mayor concentración de flavonoides obtenida en este trabajo, es probable que en el extracto obtenido el contenido de estos compuestos sea incluso mayor a los reportados por estos autores. Para poder identificar y cuantificar el contenido de estos compuestos en el extracto obtenido, se recomienda analizar estos flavonoides en particular mediante este mismo análisis.

Respecto al resultado de H-ORAC obtenido (46,36  $\mu\text{m TE/g extracto bh}$ ), resulta menor al reportado por Sotelo *et al.* (2015) en un extracto de CFC (251-342,9  $\mu\text{m TE/g extracto bh}$ ). En el estudio realizado por Azofeifa *et al.* 2018, un jugo de mora que ejerce su actividad antioxidante después de pasar por tracto gastrointestinal, presentó una capacidad antioxidante H-ORAC aproximada de 5940  $\mu\text{m TE/g extracto bs}$ . En comparación a este valor, el extracto de flavonoides del PCFC posee una menor capacidad antioxidante (2318  $\mu\text{m TE/g extracto bs}$ ). Es importante mencionar que en el estudio mencionado se concentró, purificó y secó el extracto, lo que puede haber influido en esta gran diferencia de capacidad antioxidante. Así que una vez más se recomienda la aplicación de estas etapas adicionales.

Se considera que los resultados obtenidos mediante este análisis son cuestionables dado que los ensayos de actividad antioxidante que se basan en la medición de radicales libres y la inhibición de su producción en presencia de moléculas antioxidantes, como el H-ORAC, son específicos a ciertas moléculas y al medio en el que se encuentran; y existen una gran variedad de radicales libres y especies químicas reactivas, así como de mecanismos involucrados en el estrés oxidativo. No necesariamente representa el efecto antioxidante en el organismo al consumirlos. Por lo que no dan una idea exacta de la capacidad antioxidante, especialmente cuando existe una mezcla de compuestos antioxidantes (Antolovich *et al.*, 2002). Además, en estos ensayos *in vitro* se ignoran las interacciones sinérgicas o antagonistas que pueden darse entre los compuestos que se extraen de matrices vegetales (Yapo *et al.*, 2013). Por ello, actualmente se recomienda combinar diferentes métodos de estudios *in vitro*, para una mejor determinación de la actividad antioxidante.

De acuerdo con el contenido de flavonoides encontrado en el extracto, y las actividades antiinflamatoria, antialérgica, hepatoprotectora, antitrombótica, antiviral y anticarcinogénica (Corradini *et al.*, 2011) que se les ha atribuido en estudios *in vivo* e *in vitro* se recomienda estudiar estas actividades una vez concentrado el extracto obtenido.

Durante el proceso de extracción surgieron nuevos factores que pueden influenciar la concentración de flavonoides extraídos, tales como la homogeneidad del sustrato, el tiempo de extracción y el número de extracciones. El efecto de estos factores en el contenido de flavonoides extraídos podría estudiarse en el futuro si se desea optimizar aún más el proceso de extracción. Además, para obtener un sustrato más homogéneo se recomienda tamizar el producto en polvo obtenido y volver a moler las fracciones retenidas con mayor tamaño de partícula.

Por otro lado, también se presentaron factores que podrían afectar la cuantificación de flavonoides en el extracto, como el tiempo entre la extracción y el análisis; además de las condiciones de almacenamiento del extracto. Por ello, se recomienda mantener el tiempo entre la extracción y la cuantificación constante. Así como almacenar tanto el sustrato como el extracto en condiciones de congelación en vez de refrigeración.

## 6. CONCLUSIONES

- El escaldado del PCFC en una solución de ácido cítrico al 1%, durante 5 minutos a 90°C permite reducir la actividad de las enzimas de degradación de polifenoles.
- La cuantificación de flavonoides por el método de cloruro de aluminio es efectiva para relacionar la intensidad de la señal espectrofotométrica que se obtiene con el contenido de flavonoides, como equivalentes de (-)-epicatequina, en los extractos obtenidos a partir del PCFC.
- Utilizar una mezcla de solventes agua-acetona o agua-etanol es más efectiva que los solventes puros para extraer los flavonoides del PCFC.
- La proporción de acetona/agua 60:40 resulta en una extracción de flavonoides del PCFC con mayor concentración.
- El modelo cuadrático del diseño de mezclas obtenido predice adecuadamente la extracción de flavonoides del PCFC en función de la mezcla de solventes utilizados con un nivel de confianza del 95%.
- A partir de un diseño experimental central compuesto, se obtuvo un modelo cuadrático que describe la extracción de flavonoides en relación con las variables Rss, temperatura y Cn HCl.
- La extracción con una Rss 1:16, a 45°C y una Cn HCl de 0,02 % da como resultado la mayor concentración de flavonoides de la CFC ((20,5 ± 0,9) mg EE/g sustrato).
- El modelo obtenido que relaciona las variables Rss, temperatura y Cn HCl de extracción, predice la extracción de flavonoides de la CFC con un nivel de confianza del 99%.
- El extracto de flavonoides obtenido presenta un bajo contenido de impurezas según el contenido de azúcares simples (0,27 ± 0,02 g/100g) y cenizas (0,098 ± 0,006 g/100g).
- El extracto obtenido presenta un contenido de PFT de 321 ± 20 mg EAG/g bs y capacidad antioxidante H-ORAC de 2318 ± 113 μmol TE/g bs.
- Se obtuvo un método de extracción de flavonoides a partir del PCFC más eficaz que los reportados en estudios previos.

## 7. RECOMENDACIONES

- Evaluar cuantitativamente la inhibición de las enzimas de degradación de polifenoles en el PCFC mediante la determinación de su contenido de flavonoides antes y después de los tratamientos de escaldado.
- Evaluar en conjunto las operaciones de escaldado y secado (a una temperatura menor a 50°C) de la CFC para la inactivación de las enzimas de deterioro en el procesamiento del sustrato con el fin de lograr una mayor recuperación de los flavonoides en la extracción, y midiendo la actividad residual de las enzimas o los productos de su actividad.
- Estudiar la correlación entre la concentración de flavonoides (quercetina, catequina y (-)-epicatequina) que se cuantifica por el método de cloruro de aluminio y la que se cuantifica por un método más específico como el análisis HPLC-DAD.
- Realizar una comparación de la concentración de flavonoides obtenidos a las temperaturas de 35°C y de 45°C, manteniendo las demás condiciones de extracción constantes.
- Evaluar la extracción de flavonoides del PCFC con concentraciones de HCl mayores a 0,02%.
- Sustituir el HCl por un ácido reconocido como seguro para el uso en alimentos para la extracción de los flavonoides del PCFC, como el ácido cítrico o ácido acético.
- Cuantificar y caracterizar los flavonoides en una mezcla de variedades de cacao mediante el procedimiento de extracción desarrollado.
- Concentrar el extracto obtenido mediante remoción del solvente al vacío a una temperatura menor a 50 °C para obtener un mayor contenido de PFT y flavonoides en el extracto, así como una mejor capacidad antioxidante y extracto más estable.
- Analizar por HPLC-DAD los flavonoides quercetina, catequina y (-)-epicatequina en el extracto una vez concentrado, para confirmar su presencia y realizar su cuantificación individual.
- Evaluar la estabilidad de los flavonoides en el extracto obtenido durante un tiempo determinado de almacenamiento e refrigeración a 4-5°C.
- Almacenar tanto el sustrato de extracción (PCFC) como el extracto obtenido en condiciones de congelación a -20°C en vez de refrigeración.

- Evaluar el efecto del tiempo de extracción, el número de extracciones en la concentración de flavonoides extraída.
- Tamizar el sustrato obtenido por una malla menor a 1 mm y volver a moler las fracciones retenidas antes de la extracción para tener un sustrato de tamaño más uniforme.
- Mantener el tiempo transcurrido entre la extracción y la cuantificación de flavonoides constante.
- Evaluar el efecto del tiempo entre la extracción y el análisis, así como de las condiciones de almacenamiento en la cuantificación de flavonoides.
- Se sugiere un estudio más completo de la actividad antioxidante del extracto obtenido mediante la combinación de diferentes análisis *in vitro*.
- Evaluar la posible aplicación del extracto obtenido como preservante en alimentos.
- Para la posible aplicación del extracto obtenido en alimentos funcionales, como un ingrediente para enriquecer o fortificar, se recomienda el estudio de sus propiedades biológicas, inicialmente, mediante estudios *in vitro*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- AFOAKWA, E. O. 2014. Cocoa Production and Processing Technology. Estados Unidos, CRC Press.
- AMEER, K., SHAHBAZ, H. M. y KWON, J. H. 2017. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16: 295-315.
- ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P.D., PATSALIDES, E., MCDONALD, S. y ROBARDS, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*. 127: 183-198.
- AOAC. 2002. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. Recuperado el 4 de junio del 2019 de [https://www.aoac.org/aoac\\_prod\\_imis/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/SLV\\_Guidelines\\_Dietary\\_Supplements.pdf](https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/SLV_Guidelines_Dietary_Supplements.pdf)
- AOAC International. 2005. Official Methods of Analysis. 18va ed. Revisión 1, 2006.
- AZOFEIFA, G., QUESADA, S., PÉREZ, A.M. VAILLANT, F. y MICHEL, A. Effect of an In Vitro Digestion on the Antioxidant Capacity of a Microfiltrated Blackberry Juice (*Rubus adenotrichos*). *Beverages*. 4(2): 30-42.
- AZWAN, A., KARIM, R. y MITSUI, T. 2010. Proteomic analysis of *Theobroma cacao* pod husk. *Journal of Applied Glycoscience*. 57: 245–264.
- BABATOPE, B. 2005. Rheology of cocoa-pod husk aqueous system. Part-I: Steady state flow behavior. *Rheologica Acta*. 45(1): 72–76.
- BEZERRA, M.A., SANTELLI, R.E., OLIVEIRA, E.P., VILLAR, L.S. y ESCALEIRA, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 76: 965–977.
- BOCHI, V.C, BARCIA, M.T., RODRIGUES, D., SPERONI, C.S., GIUSTI, M.M. y GODOY, H.T. 2014. Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry*. 164: 347–354.
- CAMPOS VEGA, R., NIETO FIGUEROA, K.H. y OOMAH, B.D. 2018. Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*. 81: 172–184.
- CARMIOLO GONZÁLEZ, G. 2017. Análisis de la actividad cacaotera costarricense y perspectivas de su reactivación. San José, SEPSA.

- CASTRO, J. T., BEZERRA, M. A., LIMA NETO, M. A., ANDRADE KORN, M. G., NOVAES, C. G. y SANTELLI, R. E. 2017. Use of a constrained mixture design to optimize a procedure for closed vessel microwave-assisted digestion of vegetal leaves. *Current Microwave Chemistry*. 4 (1): 1- 9.
- COMISIÓN INTERINSTITUCIONAL DE CACAO. 2018. Plan Nacional de Cacao 2018-2028. Hacia la consolidación de una agrocadena competitiva y sostenible. Recuperado el 28 de octubre del 2019 de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E14-11072.pdf>
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2019. *Theobroma cacao*. Recuperado el 6 de agosto del 2019 de [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf)
- CORNELL, J.A. 2002. *Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data*. 3ra ed. Estados Unidos, John Wiley & Sons.
- CORRADINI, E., FOGLIA, P., GIANANTI, P., GUBBIOTTI, R.S. y LAGANA, A. 2011. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantification in foods and plants. *Natural Product Research*. 25 (5): 469–495.
- CRESCENTE, O., ACOSTA, M., GUEVARA, M. y ESTABA, A. 1999. Aprovechamiento de los desechos de cacao. *Saber*. 11(2): 28-30.
- CUEVAS VALENZUELA, J., VERGARA SALINAS, J.R. y PEREZ CORREA, J.R. (eds.). 2017. *Advances in Technologies for Producing Food-relevant Polyphenols*. Estados Unidos, CRC Press.
- DE TAEYE, C., KANKOLONGO CIBAKA, M.L., JERKOVIC, V. y COLLIN, S. 2014. Degradation of (–)-Epicatechin and Procyanidin B2 in Aqueous and Lipidic Model Systems. First Evidence of “Chemical” Flavan-3-ol Oligomers in Processed Cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62: 9002-9016.
- DE LA ROSA, L.A., ALVAREZ PARILLA, E. y GONZÁLEZ AGUILAR, G.A. (eds.). 2010. *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability*. Estados Unidos, Blackwell Publishing.
- DI CIAULA, M. C., LOPES, G. C., SCARMINIO, I. S. y MELLO, J. C. 2014. Optimization of solvent mixtures for extraction from bark of *Schinus terebinthifolius* by a statistical mixture-design technique and development of a UV-Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols in the extract. *Química Nova*. 37 (1):158-163.

- EFSA NDA (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies). 2014. Scientific Opinion on the modification of the authorisation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006 following a request in accordance with Article 19 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*. 12(5): 3654-3667.
- EVERETTE, J.D., BRYANT, Q.M., GREEN, A.M., ABBEY, Y.A., WANGILA, G.W. y WALKER, R.B. 2010. A thorough study of reactivity of various compound classes towards the Folin-Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58(14): 8139–8144.
- FRANCO-CASTILLO, M., RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, M., GARCÍA-GÓMEZ, R. S., BERNAL-GONZÁLEZ, M., ESPINOSA-AQUINO, B., SOLÍS-FUENTES, J.A. y DURÁN-DE-BAZÚA, C. 2010. Reaprovechamiento integral de residuos agroindustriales: cáscara y pulpa de cacao para la producción de pectinas. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*. 1(2): 45-66.
- GALANAKIS, C. M. (ed.) 2018. *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications*. Reino Unido, Woodhead Publishing.
- GEORGÉ, S., BRAT, P., ALTER, P. y AMIOT, M.J. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53 (5): 1370-1373.
- GHOSH, D., DAS, S., BAGCHI, D. y SMARTA, R.B. (eds.) 2013. *Innovation in Healthy and Functional Foods*. Estados Unidos, CRC Press.
- GÓMEZ PAYÁN, M.N., ROMERO LÓPEZ, R.R., MOLINA ARREDONDO, R.D., TERRAZAS PORRAS, S.M. y NUÑEZ ORTEGA, O. 2015. Uso de la metodología del diseño de mezclas en el sector agrícola. *Culcyt*. 12 (55): 201- 211.
- HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, C., MORALES SILLERO, A., FERNÁNDEZ BOLAÑOS, J., BERMÚDEZ ORIA, A. AZPEITIA MORALES, A. y RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, G. 2019. Cocoa bean husk: industrial source of antioxidant phenolic extract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99(1):325-333.
- HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ, C., VIERA ALCAIDE, I., MORALES SILLERO, A.M., FERNÁNDEZ BOLAÑOS, J. y RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, G. 2018. Bioactive compounds in Mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*. 240: 831-839.
- HERRERA, C.H., BOLAÑOS, N.V. y LUTZ, G.C. 2003. *Química de Alimentos: Manual de laboratorio*. Costa Rica, Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- HO, Y.C., YU, H.T., SU, N.W. 2012. Re-examination of Chromogenic Quantitative Assays for Determining Flavonoid Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 2674–2681.

- HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J.A. Y DEEMER, E.K. 2002. Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (7): 1815-1821.
- HURTADO VIDARTE, R. M. y ORTIZ ROBLES, L. S. 2018. Componentes fitoquímicos y capacidad antioxidante de cáscaras de frutas de mayor consumo en el Perú. Tesis de licenciatura en Nutrición y Dietética. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Lima, Perú.
- ICCO (International Cocoa Organization). 2017. Informe anual. Recuperado el 15 de abril del 2019 de [https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat\\_view/1-annual-report.html](https://www.icco.org/about-us/international-cocoa-agreements/cat_view/1-annual-report.html)
- ICCO (International Cocoa Organization). 2018. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. August 2018. Recuperado el 16 de abril del 2018 de <https://www.icco.org/aboutus/icco-news/394-august-2018-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>.
- IGNAT, I. VOLF, I y POPA, V.I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*. 126: 1821–1835.
- KARIM, A., AZLAN, A., ISMAIL, A., HASHIM, P. y ABDULLAH, N. A. 2014a. Antioxidant properties of cocoa pods and shells. *Malaysian Cocoa Journal*. 8: 49–56.
- KARIM, A. A., AZLAN, A., ISMAIL, A., HASHIM, P., ABD GANI, S. S., ZAINUDIN, B. H. y ABDULLAH, N. A. 2014b. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14: 381-394.
- KOSSEVA, M. R. y WEBB, C. (eds). 2013. *Food Industry Wastes. Assessment and Recuperation of Commodities*. Estados Unidos, Academic Press.
- KOWALSKA, H., CZAJKOWSKA, K., CICHOWSKA, J. y LENART, A. 2017. What's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science & Technology*. 67: 150-159.
- LAMUELA RAVENTÓS, R. M., ROMERO PÉREZ, A. I., ANDRÉS LACUEVA, C. y TORNERO, A. 2005. Review: Health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International*. 11 (3): 159–176.
- LECUMBERRI, E., MATEOS, R., IZQUIERDO-PULIDO, M., RUPÉREZ, P., GOYA, L. y BRAVO, L. 2006. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao L.*). *Food Chemistry*. 104: 948–954.

- LIU, Y., SHI, Z., MAXIMOVA, S., PAYNE, M. J. y GUILTINAN, M. J. 2013. Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: Genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanin reductase, and leucoanthocyanidin reductase. *BMC Plant Biology*. 13(1): 202-221.
- MARTÍNEZ, R., TORRES, P., MENESES, M.A., FIGUEROA, J.C. PÉREZ ÁLVAREZ, J.A. y VIUDA MARTOS, M. 2012. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao L.*) co-products. *Food Research International*. 49: 39–45.
- MONTGOMERY, D. C. 2004. *Diseño y análisis de experimentos*. 2 ed. México, Limusa.
- MRMOSANIN, J.M., PAVLOVIC, A.N., VELJKOVIC, J.N., MITIC, S.S., TOSIC, S.B. y MITIC, M.N. 2015. The effect of storage temperature and thermal processing on catechins, procyanidins and total flavonoid stability in commercially available cocoa powders. *International Journal of Food Science & Technology*. 13(1): 39-49.
- NGUYEN, V. T. 2015. Mass proportion, proximate composition and effects of solvents and extraction parameters on pigment yield from cacao pod shell (*Theobroma cacao L.*). *Journal of Food Processing and Preservation*. 39: 1414–1420.
- NIST. 2012. NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods. Recuperado el 7 de julio del 2019 de <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/>
- OKIYAMA, D., SOARES, I. D., CUEVAS, M. S., CREVELIN, E. J., MORAES, L., MELO, M. P., OLIVEIRA, A. L. y RODRIGUES, C. 2018. Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. *Food Research International*. 114: 20–29.
- PANAK BALENTÍC, J., ACKAR, D., JOKIC, S., JOZINOVIC, A., BABIC, J., MILICEVIC, B., SUBARIC, D. y PAVLOVIC, N. 2018. Review Cocoa Shell: A By-Product with Great Potential for Wide Application. *Molecules*. 23: 1-14.
- QUEIROZ, C., MENDES, M. L., FIALHO, E. y VALENTE-MESQUITA, V. L. 2008. Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*. 24 (4): 361–375.
- QUIRÓS BLANCO, A.M. 2016. Obtención de un extracto etanólico rico en polifenoles a partir de un subproducto del procesamiento industrial de mora. Tesis de licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- RACHMAWATY, MU'NISA, A., PAGARRA, H., y MAULANA, Z. 2018. Active compounds extraction of cocoa pod husk (*Thebroma cacao L.*) and potential as Fungicides. *Journal of Physics: Conference Series*. 1028 (1).
- RAHMAN, A. (ed.) 2018. *Studies in Natural Products Chemistry*. vol 59. Reino Unido, Academic Press.









- RAMOS, R. T. M., BEZERRA, I. C. F., FERREIRA, M. R. A. y LIRA SOARES, L. A. 2017. Spectrophotometric Quantification of Flavonoids in Herbal Material, Crude Extract, and Fractions from Leaves of *Eugenia uniflora* Linn. *Pharmacognosy research*. 9 (3): 253-260.
- REID, N. 2000. *The theory of the design of experiments*. Boca Ratón, Chapman & Hall.
- REVINDRAN, R. y JAISWAL, A. K. 2016. Review. Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends in Biotechnology*. 34 (1): 58-69.
- RIVERA GARRO, S.E. 2015. Estudio de las condiciones de limpieza-desinfección, escaldado y secado de la broza de café, en una mipyme, para la conservación de la mayor actividad antioxidante. Tesis de licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos. San José.
- SAGAR, N. A., PAREEK, S., SHARMA, S., YAHIA, E. M. y LOBO, G. 2018. Fruit and Vegetable Waste: Bioactive Compounds, Their Extraction, and Possible Utilization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 17: 512-531.
- SANTOS FELIX, A. C., NOVAES, C. G., PIRES ROCHA, M., BARRETO, G. E., DO NASCIMENTO, B. B. y GIRALDEZ ALVARES, L. D. 2018. Mixture Design and Doehlert Matrix for the Optimization of the Extraction of Phenolic Compounds from *Spondias mombin* L. Apple Bagasse Agroindustrial Residues. *Frontiers in Chemistry*. 5: 116.
- SARTINI, S., ASRI, R. M. y ISMAIL, I. 2017. Effect of pretreatments before sun drying on cocoa pod husk against phenolic concentration in their extract. *BIOMA: Jurnal Biologi Makassar*. 2(1): 15–20.
- SASIDHARAN, S., CHEN, Y., SUNDRAM, K. M. y YOGHA LATHA, L. 2010. Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 8(1): 1-10.
- SHAHIDI, F. y AMBIGAIPALAN, P. 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects- A review. *Journal of Functional Foods*. 18: 820-897.
- SHAVEZ BEG, M., AHMAD, S., JAN, K. y BASHIR, K. 2017. Status, supply chain and processing of cocoa - A review. *Trends in Food Science & Technology*. 66: 108-116.
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J. y CROUCH, S. R. 2016. *Principles of Instrumental Analysis*. 7ma ed. Estados Unidos, Cengage Learning.
- SOBAMIWA, O. y LONGE, O. G. 1994. Utilization of cocoa pod pericarp fractions in broiler chick diets. *Animal Feed Science and Technology*. 47(3–4): 237–244.

- SOTELO, C. L., ALVIS, B. A. y ARRÁZOLA, P. G. 2015. Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas. 9(1): 124-134.
- SOTO HERNÁNDEZ, M. (ed.). 2017. Phenolic Compounds. Natural Sources, Importance and Applications. Croatia: Intech Open.
- SPENCER, P. E., CHAUDRY, F., PANNALA, A.S., SRAI, S.K., DEBNAM, E. Y RICE EVANS, C. 2000. Decomposition of Cocoa Procyanidins in the Gastric Milieu. Jeremy Biochemical and Biophysical Research Communications. 272: 236- 241.
- STALIKAS, C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. Journal of Separation Science. 30: 3268-3295.
- SULAIMAN, A., SOO, M. J., YOON, M. M. L., FARID, M. y SILVA, V. M. 2015. Modeling the polyphenoloxidase inactivation kinetics in pear, apple and strawberry purees after high pressure processing. Journal of Food Engineering. 147: 89–94.
- VALADEZ CARMONA, L., PLAZOLA JACINTO, C.P., HERNÁNDEZ ORTEGA, M. HERNÁNDEZ NAVARRO, M.D. VILLAREAL, F., NECOECHEA MONDRAGÓN, H., ORTIZ MORENO, A. y CEALLOS REYES, G. 2017. Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). Innovative Food Science and Emerging Technologies. 41: 378–386.
- VALADEZ CARMONA, L., ORTIZ MORENO, A., CEBALLOS REYES, G., MENDIOLA, J. A. e IBÁÑEZ, E. 2018. Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. The Journal of Supercritical Fluids. 131: 99–105.
- VILLAMIZAR JAIMES, A. R. y LÓPEZ GIRALDO, L. J. 2017. Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. Respuestas. 22 (1): 75-83.
- VRIESMANN, L. C., CASTANHO AMBONI, R. D. y OLIVEIRA PETKOWICZ, C. L. 2011. Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. Industrial Crops and Products. 34: 1173– 1181.
- WATSON, R. R. (ed). 2019. Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation. Reino Unido, Academic Press.
- YAPO, B. M., BESSON, V., KOUBALA, B. B. y KOFFI, K. L. 2013. Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. American Journal of Food and Nutrition. 1(3): 38-46.
- ZHANG, Q. W., LIN, L. G. y YE, W. C. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. Chinese Medicine. 13:20.



## 9. ANEXOS

**Cuadro XVII.** Prueba de adición de catecol 1%, a muestras de pericarpio del fruto de cacao sometidas a diferentes condiciones de temperatura, tiempo y concentración de ácido cítrico en operación de escaldado. A los trozos de la izquierda de cada imagen se les adicionó la solución de catecol al 1%, a los de la derecha no.<sup>1</sup>

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Concentración de ácido cítrico	
		0	1
80	5	A) 	B) 
	10	C) 	D) 
90	5	E) 	F) 
	10	G) 	H) 

<sup>1</sup> Las letras A-H corresponden a los diferentes tratamientos

**Cuadro XVIII.** Ecuaciones utilizadas para la cuantificación de flavonoides en los extractos obtenidos en los tratamientos de cada objetivo específico, obtenidas a partir de las respectivas curvas de calibración.

Objetivo	Tratamiento	Ecuación empleada para cuantificar flavonoides	R <sup>2</sup>
2.2.2	1,2,6	$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs - 0,007}{0,0315}$	0,999
	3,4,5,7,8,9,10,11	$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs + 0,004}{0,0455}$	0,999
	Triplicado verificación del modelo	$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs - 0,003}{0,0286}$	0,998
2.2.3	1,5,10,13,16	$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs - 0,004}{0,0373}$	0,999
	4,6,7,8,12,14,17,18	$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs - 0,0008}{0,0295}$	0,998
	2,3,9,11	$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs - 0,004}{0,0327}$	0,999
	15,19,20	$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs - 0,003}{0,0286}$	0,998
	Triplicado verificación del modelo	$Cn\left(\frac{mg_{EE}}{L}\right) = \frac{Abs - 0,003}{0,0321}$	0,999

**Cuadro XIX.** Análisis de varianza de los modelos de regresión evaluados para la selección del que mejor representa los resultados experimentales.

Modelo	SS	df	MS	Error SS	Error df	Error MS	F	P	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> <sub>ajd</sub>
Lineal	3,787	2	1,894	4,079	8	0,5099	3,714	0,0723	0,4814	0,3518
Cuadrático	3,731	3	1,244	0,348	5	0,0697	17,854	0,0042	0,9557	0,9114
Cúbico especial	0,023	1	0,023	0,325	4	0,0813	0,283	0,6233	0,9586	0,8966

**Cuadro XX.** Valores p de coeficientes factores de ecuación del modelo cuadrático de mezcla de solventes de extracción de flavonoides.

Factor	Coefficiente	P
Acetona (A)	0,18	0,50651
Agua (B)	-2,34	0,03848*
Etanol (C)	0,08	0,76377
AB	13,40	0,00097*
AC	0,27	0,80709
BC	12,27	0,00146*

\*: factor significativo (<0,05)

**Cuadro XXI.** Análisis de varianza del modelo de superficie de respuesta de las variables de extracción de flavonoides de la CFC.

Factor	SS	Df	MS	F	P
(1) Rss (L)	89,87	1	89,87	74,33	0,0003
Rss (Q)	83,25	1	83,25	68,85	0,0004
(2)T (L)	29,15	1	29,15	24,11	0,0044
T (Q)	9,16	1	9,16	7,58	0,0402
(3) Cn HCl (L)	0,65	1	0,65	0,54	0,4969
(3) Cn HCl (Q)	2,51	1	2,51	2,07	0,2094
1L*2L	6,72	1	6,72	5,55	0,0650
1L*3L	4,64	1	4,64	3,83	0,1075
2L*3L	16,16	1	16,16	13,36	0,0147
Falta de ajuste	21,08	5	4,22	3,49	0,0983
Error puro	6,05	5	1,21		
SS total	262,39	19			

**Cuadro XXII.** Valores p de coeficientes de factores de ecuación del modelo cuadrático de condiciones de extracción de flavonoides.

<b>Factor</b>	<b>Coefficiente</b>	<b>p</b>
(1) Rss (L)	2,57	0,0003*
Rss (Q)	-2,41	0,0004*
(2)T (L)	1,46	0,0044*
T (Q)	-0,80	0,0402*
(3) Cn HCl (L)	0,22	0,4969
(3) Cn HCl (Q)	-0,42	0,2094
1L*2L	0,92	0,0650
1L*3L	-0,76	0,1075
2L*3L	1,42	0,0147*

\*: factor significativo (<0,05)