



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**

*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**

TITULACIÓN DE INGENIERO QUÍMICO

**Determinación de compuestos antioxidantes en subproductos de cacao  
“testa”**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

**AUTORA:** Bustamante Jiménez, Karla Daniela.

**DIRECTORA:** Guamán Balcázar, María del Cisne, Ing.

LOJA-ECUADOR

2014



## APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Ingeniera.

María del Cisne Guamán Balcázar.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación: **Determinación de compuestos antioxidantes en subproductos de cacao “testa”** realizado por **Bustamante Jiménez Karla Daniela**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2014.

f).....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Bustamante Jiménez Karla Daniela** declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: Determinación de compuestos antioxidantes en subproductos de cacao “testa”, de la Titulación de Ingeniería Química, siendo Ing. María del Cisne Guamán Balcázar directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

F: .....

Autora: Bustamante Jiménez Karla Daniela

Cédula: 1105148306

## DEDICATORIA

A Dios,

Por ser el creador de todo y por guiarme, bendecirme y acompañarme día a día en el transcurso de mi vida.

A mis padres, y hermanas

Por su confianza y motivación, ya que eso ha sido mi inspiración para seguir luchando por alcanzar mis metas, y sobre todo por su esfuerzo constante, que me ha permitido crecer moral e intelectualmente.

A mi tía, Elva

Por ser mi segunda madre, pues siempre me ha brindado tiempo, cariño, y sus sabios consejos en el momento oportuno.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por la dicha de gozar de salud y vida, por el don de fe que me ha concedido y por permitirme realizar uno más de mis sueños.

A la Ing. María del Cisne Guamán, quien como directora de tesis ha sabido compartir sus conocimientos y experiencia, para poder realizar este proyecto de la mejor manera, gracias también por su paciencia y ayuda.

A los Ingenieros: Miguel Ángel Meneses y Chabaco Armijos por su colaboración como miembros del jurado de tesis, que han sabido guiar esta investigación con sus observaciones y sugerencias, por su tiempo y dedicación.

Al Ing. Geovanny Figueroa por su ayuda como tutor encargado, en el desarrollo de esta tesis, gracias por su tiempo, y predisposición para culminar este trabajo de la mejor manera.

A mis profesores, que han sabido despejar mis inquietudes con sus conocimientos, durante mi crecimiento académico.

A mi familia, por motivarme día a día, por creer en mí y por su cariño infalible.

A mis amigas y compañeras, por su ánimo y compañía durante todos los años de estudio, en especial a Johana Carpio con quien hemos trabajado arduamente para lograr este propósito

## ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDO	VI
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
NOMENCLATURAS	X
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	6
1.1 Origen y variedades de <i>Theobroma cacao</i> L.	7
1.2 Producción de cacao en el Ecuador.	7
1.3 Composición química y subproductos del cacao.	8
1.4 Técnicas tradicionales de extracción	9
1.5 Tecnología de extracción con fluidos supercríticos.	10
1.5.1 El Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) como fluido supercrítico.	11
1.5.2 Extracciones con Fluidos supercríticos.	11
1.5.3 Descripción del equipo de extracción con Fluidos supercríticos.	12
1.6 Antioxidantes y polifenoles de <i>Theobroma cacao</i> L.	13
1.7 Determinación de fenoles totales.	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1 Materiales.	17
2.2 Muestras.	17
2.3 Caracterización y preparación de la muestra.	18
2.4 Obtención de extractos lipofílicos en equipo de fluidos supercríticos.	18
2.5 Extracción Soxhlet.	21
2.6 Determinación de fenoles totales.	21
2.7 Determinación de capacidad antioxidante.	22
2.7.1 Método ABTS.	22
2.7.2 Método DPPH.	22
2.7.3 Método FRAP.	22

2.8	<b>Método experimental</b>	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>	<b>24</b>
3.1	Rendimientos de extracción	25
3.2	Cuantificación de fenoles totales	26
3.3	Determinación de capacidad antioxidante	27
3.3.1	Método ABTS.	27
3.3.2	Método DPPH.	28
3.3.3	Método FRAP.	29
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>31</b>
4.1	CONCLUSIONES	32
4.2	RECOMENDACIONES	33
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>34</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>41</b>
ANEXO 1.	ESQUEMAS DE METODOLOGÍA	41
ANEXO 2.	RESULTADOS DE EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	46
2.1	Resultados de rendimiento	46
2.2	Cuantificación de fenoles totales	47
2.3	Determinación de capacidad antioxidante por método ABTS	49
2.4	Determinación de capacidad antioxidante por método DPPH	51
2.5	Determinación de capacidad antioxidante por método FRAP	53
ANEXO 3.	RESULTADOS DE EXTRACCIÓN SOXHLET	55
3.1	Rendimientos de extracción	55
3.1	Cuantificación de fenoles totales	56
3.2	Determinación de capacidad antioxidante por método ABTS	57
3.3	Determinación de capacidad antioxidante por DPPH	59
3.4	Determinación de capacidad antioxidante por método FRAP	60
ANEXO 4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62

## ÍNDICE DE TABLAS

	pág.
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Tabla 1. 1</b> Composición química del cacao	8
<b>Tabla 1. 2</b> Propiedades del dióxido de carbono	11
<b>Tabla 1. 3</b> Compuestos extraídos con fluidos supercríticos	12
<b>ANEXO 2</b>	
<b>Tabla 2. 1</b> Rendimientos de extracción de fluidos supercríticos	46
<b>Tabla 2. 2</b> Cuantificación de fenoles totales.	48
<b>Tabla 2. 3</b> Determinación de capacidad antioxidante por método ABTS	50
<b>Tabla 2. 4</b> Determinación de capacidad antioxidante por método DPPH.	52
<b>Tabla 2. 5</b> Determinación de capacidad antioxidante por método FRAP.	53
<b>ANEXO 3</b>	
<b>Tabla 3. 1</b> Rendimientos de extracción soxhlet	55
<b>Tabla 3. 2</b> Cuantificación de fenoles totales en extractos Soxhlet	57
<b>Tabla 3. 3</b> Determinación de capacidad antioxidante por método ABTS	58
<b>Tabla 3. 4</b> Determinación de capacidad antioxidante por método DPPH	60
<b>Tabla 3. 5</b> Determinación de capacidad antioxidante por método FRAP	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Figura 1. 1</b> Testa de cacao	9
<b>Figura 1. 2</b> Diagrama de T vs. P para conocer el punto crítico	10
<b>Figura 1. 3</b> Estructuras básicas de ácidos fenólicos y flavonoides.	13
<b>Figura 1. 4</b> Clasificación de los flavonoides.	14
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Figura 2. 1</b> Ubicación geográfica de Napo	17
<b>Figura 2. 2</b> Secado de muestra en estufa	18
<b>Figura 2. 3</b> Cápsulas dentro de estufa	18
<b>Figura 2. 4</b> Tamizado de muestra	18
<b>Figura 2. 5</b> Diagrama de flujo del equipo de fluidos supercríticos	19
<b>Figura 2. 6</b> Extractor dentro de estufa	20
<b>Figura 2. 7</b> Fotografía del equipo de fluidos supercríticos	20
<b>Figura 2. 8</b> Extracto de extracción supercrítica (izquierda) y soxhlet (derecha) de testa de cacao	21
<b>CAPITULO III</b>	
<b>Figura 3. 2</b> Comparación de rendimientos de extracción a diferentes condiciones	26
<b>Figura 3. 3</b> Comparación de las concentraciones de fenoles totales	27
<b>Figura 3. 4</b> Concentraciones de capacidad antioxidante por método ABTS	28
<b>Figura 3. 5</b> Concentraciones de capacidad antioxidante por método DPPH	29
<b>Figura 3. 6</b> Concentraciones de capacidad antioxidante por método FRAP	30
<b>ANEXO 1</b>	
<b>Figura 1.</b> Preparación de la muestra	41
<b>Figura 2.</b> Proceso de extracción supercrítica	41
<b>Figura 3.</b> Procedimiento de fenoles totales.	42
<b>Figura 4.</b> Capacidad Antioxidante por el método ABTS.	43
<b>Figura 5.</b> Capacidad antioxidante por método DPPH.	44
<b>Figura 6.</b> Capacidad antioxidante por método FRAP.	45

## NOMENCLATURAS

EtOH: Etanol absoluto

MeOH: Metanol

SFE: Extracción con Fluidos Supercríticos

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

ABTS: 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolín-6-sulfónico)

TPTZ: 2, 4, 6 - tripiridil-s-triazina

TROLOX: ácido 6- hidroxil-2, 5, 7, 8- tetrametilcromo- 2- ácido carboxílico

µmol ET/ g: micromoles equivalentes de trolox/ gramo de muestra seca

mg GAE/ 100 g: miligramos equivalentes de ácido gálico/ 100 gramos de muestra

ml: mililitro

µL: microlitro

mM: milimolar

g: gramo

ρ: densidad

mg: miligramo

N: Normal

## RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la disponibilidad de testa de cacao (*Theobroma cacao* L.) como posible fuente de antioxidantes. Las muestras empleadas fueron suministradas por la Fundación Kallari ubicada en Napo-Ecuador. Se utilizó CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas como solvente de extracción. El tamaño de partícula de la muestra empleada estuvo comprendido entre >250 y ≤500 μm, ésta fue tratada con un flujo de 10000 ml CO<sub>2</sub>/min durante 3 horas. Se determinó el efecto de la temperatura (35 y 40 °C) y presión (150 y 200 bares) sobre el rendimiento de extracción, concentración de fenoles totales y capacidad antioxidante de los extractos. Se utilizó Soxhlet con hexano como método de comparación. El contenido de fenoles totales se midió por el método Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante fue evaluada por los métodos ABTS, DPPH y FRAP. Se escogió como mejores condiciones 200 bares y 35 °C, obteniendo 2,87 % en rendimiento; una concentración de fenoles totales de 35,43 mg GAE/100 g y concentraciones de capacidad antioxidante según los métodos ABTS, DPPH y FRAP de: 1,48; 4,09 y 1,48 μmol ET/g respectivamente.

**Palabras clave:** testa de cacao, fluidos supercríticos, rendimiento, fenoles totales, capacidad antioxidante.

## ABSTRACT

In the present study the availability of cocoa bean shell (*Theobroma cacao* L.) as possible source of antioxidants was evaluated. The samples used were supplied by the Foundation Kallari located in Napo-Ecuador. Was used CO<sub>2</sub> in supercritical conditions as the extraction solvent. The particle size of the sample used was between >250 and ≤500 microns, it was treated with a flow of 10 000 ml CO<sub>2</sub>/min for 3 hours. The effect of temperature (35 and 40 °C) and pressure (150 and 200 bar) was evaluated over the extraction yield, total phenolic concentration and antioxidant capacity of the extracts. Was used Soxhlet with hexane as comparison method. The content of total phenolic was measured by the Folin-Ciocalteu method and the antioxidant capacity was evaluated by the methods ABTS, DPPH and FRAP. The best conditions chosen were 200 bar and 35 °C, obtaining 2,87 % in yield; a concentration of total phenolics of 35,43 mg GAE/100 g and concentrations of antioxidant capacity according to the methods ABTS, DPPH and FRAP of: 1,48; 4,09 and 1,48 mole ET/g respectively.

**Key words:** cocoa bean shell, supercritical fluids, yield, total phenolic, antioxidant capacity.

## INTRODUCCIÓN

La planta *Theobroma cacao* L. es conocida debido a que sus semillas son utilizadas en la elaboración de diversos productos como: el chocolate, el cacao en polvo y la manteca de cacao, que son a su vez, materia prima para otros derivados.<sup>1</sup> Ecuador por sus condiciones geográficas y su riqueza en recursos biológicos, es productor por excelencia de Cacao Arriba fino y de aroma (63% de la producción mundial) ya que en el 2013 se alcanzó una producción de 137 327 toneladas métricas, esto representa un 5% de la producción mundial de cacao.<sup>2</sup>

En el proceso de post cosecha del cacao se obtiene como subproductos: cáscara, testa y mucílago; los mismos que en algunos casos suelen ser utilizados en la alimentación animal, o como abonos en la fertilización de plantas.<sup>3</sup> En 100 gramos de semillas de cacao existe 16,68 % de testa, el porcentaje restante corresponde al grano.<sup>4</sup>

Estos subproductos han tenido poca o ninguna utilización en nuestro país; pero por estudios se conoce que son fuente de polifenoles, Martínez et al.<sup>5</sup> muestran resultados de fenoles totales en testa de cacao con valores entre 80,17 a 144,83 mg de GAE/ 100 g; también se indica buena capacidad antioxidante, alcanzando valores entre 2,56 a 4,56  $\mu\text{mol ET/g}$  en el ensayo ABTS; 1,57 a 4,05  $\mu\text{mol ET/g}$  en el ensayo de DPPH y 0,67 y 1,78  $\mu\text{mol ET/g}$  de muestra en el ensayo FRAP.<sup>5</sup>

Los grupos de polifenoles más abundantes en cacao, son metabolitos tipo flavonoide, especialmente tres grupos básicos: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%),<sup>6</sup> esto les da el potencial de ser usados para otros fines, como obtención de compuestos bioactivos, o empleados como ingredientes en nutracéuticos y alimentos funcionales, pues estos compuestos son beneficiosos para la salud, por sus propiedades antioxidantes, antivirales, antiinflamatorias<sup>7</sup>, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y varias patologías.<sup>8</sup>

Las extracciones tradicionales como soxhlet y maceración dinámica, que utilizan solventes tóxicos; contaminan el extracto y el medio ambiente, para ello como posible alternativa se propone la aplicación de una nueva tecnología, que es la extracción mediante el uso de fluidos supercríticos,<sup>9</sup> la misma que logra maximizar la calidad del extracto evitando su contaminación, ya que no deja residuos tóxicos en el producto final, permitiéndonos así obtener una fracción inocua, disminuyendo o eliminando el uso de solventes tóxicos, reduciendo largos tiempos de proceso y evitando la degradación de los compuestos debido al tratamiento térmico.<sup>10</sup>

Por los antecedentes ya mencionados acerca de los subproductos de cacao y una nueva técnica de aplicación; a través de este estudio, se busca aprovechar estos recursos de manera significativa, mejorando la calidad de los extractos en cuanto a su contenido de compuestos polifenólicos y de antioxidantes, contribuyendo al bienestar económico, social y ambiental, de las comunidades cacaoteras y de la sociedad en general.

## **OBJETIVOS**

### **Propósito u objetivo de la investigación.**

- Contribuir al aprovechamiento industrial de los subproductos de cacao evaluando la riqueza de la testa del cacao como fuente de antioxidantes.

### **Componentes u objetivos específicos de la investigación.**

- Cuantificar el rendimiento de extracción de las fracciones lipofílicas extraídas.
- Determinar fenoles totales en los extractos obtenidos a partir de testa de cacao.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos empleando tres métodos diferentes (DPPH, ABTS y FRAP).

## **1. FUNDAMENTO TEÓRICO**

## **1.1 Origen y variedades de *Theobroma cacao* L.**

El cacao cuyo nombre científico es *Theobroma cacao* L. pertenece a la familia de las *Malvaceae*, subfamilia *Sterculioideae* y comprende 22 especies en seis secciones. Este cultivo se desarrolla en países de África, América central, Sur América, Asia y Oceanía.<sup>11</sup> El área de distribución natural se extiende en América desde la cuenca del Amazonas por el sur hasta la región meridional de México.<sup>12</sup>

Generalmente los cacaos cultivados se dividen en tres variedades principales: 1) el criollo que se cultiva en los países de América Central y América del Sur también en la India; es conocido como cacao fino y de aroma, de gran calidad, reservado para la elaboración de chocolates más finos, representa el 10% de la producción mundial.<sup>13</sup> 2) El forastero originario de la cuenca superior del Amazonas; en su mayoría se cultiva en Brasil, África Occidental, América Central y el Caribe, con cerca del 80% de la producción mundial.<sup>12</sup> 3) El trinitario que es producto de las hibridaciones ocurridas entre en Criollo y el Forastero, es originario de Trinidad, tiene la robustez del cacao forastero y el sabor del criollo,<sup>13</sup> y representa del 10-15 % de la producción mundial.<sup>12</sup>

Sin embargo, nuevos estudios han mostrado que esta clasificación no describe suficientemente la variabilidad de la especie, ya que la mayoría de las formas de cacao cultivadas mundialmente hoy en día son de orígenes mixtos, que no pueden ser completamente incluidos dentro de esta división clásica.<sup>12</sup> Es por ello que en Ecuador se produce el cacao nacional que es clonado, se originó en la franja de bosque tropical del occidente de los Andes entre Colombia y Ecuador, especialmente en la región del río Guayas arriba. Este grano tiene una demanda particular en el mercado especialmente europeo por su sabor, pues es indispensable en la elaboración de los mejores y más finos chocolates del mundo.<sup>14</sup>

## **1.2 Producción de cacao en el Ecuador.**

La comercialización y exportación de cacao constituyen un sector relevante de la economía de nuestro país, ocupando en el mercado mundial el séptimo puesto entre los países exportadores. En el 2010 se alcanzó una producción nacional de 116242.35 toneladas generando un ingreso de 349 919.75 dólares.<sup>13</sup>

El cacao ecuatoriano es reconocido mundialmente por sus marcadas características de aroma y color sumamente apreciadas en la preparación de chocolates finos, revestimientos y coberturas. El cacao representa un rubro de exportación agrícola en el país ya que se siembra en la costa, sierra y oriente, la región que concentra la mayor superficie cosechada

de cacao es la región costa, que en el 2009 registró el 80% de la superficie a nivel nacional.<sup>15</sup>

### 1.3 Composición química y subproductos del cacao.

La composición química de los granos de cacao (según Wakao, S. 2002) depende de varios factores entre los que se puede citar: tipo de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de la fermentación, secado y el subsecuente procesamiento de los granos.<sup>16</sup> Los principales constituyentes del cacao son agua, grasa, compuestos fenólicos, materia nitrogenada (proteínas y purinas incluyendo teobromina y cafeína), almidón y otros carbohidratos (ver Tabla 1.1).<sup>17</sup>

**Tabla 1. 1** Composición química del cacao

COMPONENTES%	Grano	Cáscara	Germen
<b>Agua</b>	5,0	4,5	8,5
<b>Grasa</b>	54	1,5	3,5
<b>Cafeína</b>	0,2		
<b>Teobromina</b>	1,2	1,4	
<b>Polihidroifenoles</b>	6,0		
<b>Proteína bruta</b>	11,5	10,9	25,1
<b>Mono y oligosacáridos</b>	1,0	0,1	2,3
<b>Almidón</b>	6,0		
<b>Pentosanos</b>	1,5	7,0	
<b>Celulosa</b>	9,0	26,5	4,3
<b>Ácidos carboxílicos</b>	1,5		
<b>Otras sustancias</b>	0,5		
<b>Ceniza</b>	2,6	8,0	6,3

Fuente: Belitz et al.<sup>17</sup>

### Subproductos del cacao

La industria chocolatera, genera varios subproductos como: cáscara, testa y mucílago de cacao, los cuales resultan al abrir los frutos para extraer los granos y son considerados fuente de fibra dietaria.<sup>18</sup>

### Cáscara

Son el subproducto más voluminoso, constituido por cáscaras de la mazorca de cacao, las cuales son abandonadas en el campo, no son reincorporadas al cultivo pero pueden ser utilizadas en la alimentación animal,<sup>19</sup> para producir compost, y en fertilización de plantas u horticultura,<sup>20-21</sup> contrariamente su abandono en el campo constituye un foco potencial de enfermedades.<sup>14</sup>

## Testa

La testa o cascarilla (Figura 1.1) es obtenida al descascarillar la nuez de cacao, tiene color café y olor característico,<sup>14</sup> representa entre un 6-16% del peso de la almendra de grano.<sup>4-22</sup> Este subproducto contiene del 10 al 15% de azúcar, 1% de pectinas y el 1.5% de ácido cítrico, parte de esta testa es necesaria para la producción de alcohol y ácido acético en la fermentación de las almendras y es usada para la preparación de mermeladas en Brasil y Venezuela.<sup>23-24</sup>



**Figura 1. 1** Testa de cacao

Fuente: La Autora.

## 1.4 Técnicas tradicionales de extracción

### Destilación por arrastre de vapor

En la destilación por arrastre de vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por éste y otros “no volátiles”. La condición más importante para que este tipo de destilación se realice es que determinada sustancia sea insoluble en agua y ligeramente volátil frente otros productos no volátiles, ya que el producto destilado formará dos fases al condensarse, permitiendo la separación del producto y del agua fácilmente. El equipo requerido es sencillo: un generador de vapor, un reactor o cámara de extracción, un condensador y un vaso florentino. Se puede decir que es un método sencillo y de bajo costo, pero requiere largos periodos de tiempo y en algunos casos bajos rendimientos.<sup>25</sup>

### Extracción con disolventes

Se trata de un proceso físico, donde están implicadas la fase sólida y líquida de la muestra.<sup>26</sup> Dentro de este proceso se puede citar la extracción soxhlet cuya función es recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente del disolvente que se encuentra en evaporación continua arrastrando consigo los principios activos de la materia prima contenida en los cartuchos desechables. Para recuperar la sustancia de interés se debe evaporar el solvente de extracción, en este proceso es importante tener en cuenta: la

selección del solvente, la matriz sólida y las condiciones de operación.<sup>27</sup> También existe la extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción mediante fluidos supercríticos entre otras, es en la última técnica de la que se hablará a continuación.<sup>28</sup>

### 1.5 Tecnología de extracción con fluidos supercríticos.

La extracción con fluidos supercríticos es una técnica de separación de sustancias disueltas o incluidas dentro de una matriz, basada fundamentalmente en la capacidad que tienen determinados fluidos de controlar su poder solvente el mismo que puede ser elevado, dependiendo de las condiciones de presión y temperatura aplicadas, siendo necesario alcanzar su punto crítico (figura 1.2), este se define como la fase donde determinada sustancia puede comportarse como un gas o un líquido a la vez.<sup>29</sup>

Para el proceso de extracción con fluidos supercríticos es necesario: el pretratamiento del material vegetal, adecuación del CO<sub>2</sub> a las condiciones de operación, extracción de los componentes solubles en un solvente supercrítico y la separación de los solutos extraídos del disolvente.<sup>30</sup> La extracción se puede aplicar a una matriz sólida, líquida o viscosa.<sup>31</sup> Ésta tecnología ha tenido notable interés industrial en las últimas tres décadas, se basa en la utilización de un fluido, precisamente supercrítico, como disolvente alternativo, siendo el más utilizado el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico.<sup>32</sup>

Una de las ventajas de los fluidos supercríticos en la industria de alimentos, es su gran beneficio, comenzando por su respuesta a la demanda de producir sin dañar el medio ambiente, ya que en general los solventes utilizados en otras técnicas de extracción son contaminantes.<sup>33</sup>

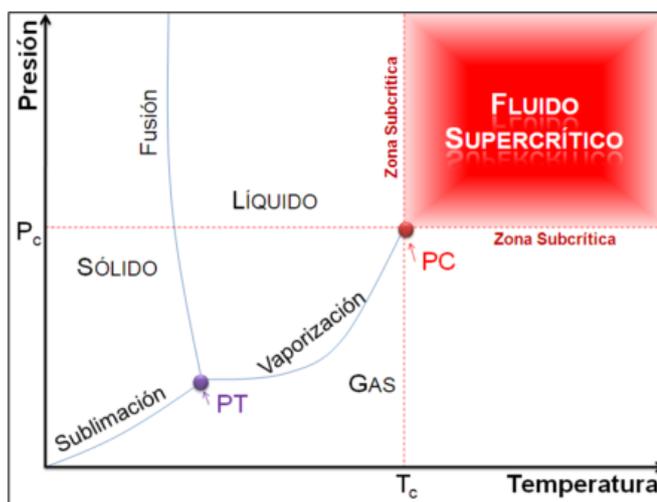


Figura 1. 2 Diagrama de T vs. P para conocer el punto crítico

Fuente: Vázquez<sup>34</sup>

### 1.5.1 El Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como fluido supercrítico.

Un fluido debe poseer una serie de propiedades: alta capacidad disolvente, baja o nula toxicidad, bajo precio, fácil de obtener, no ser corrosivo, no ser agresivo con el medio ambiente, entre otras. El dióxido de carbono es el que mejor cumple con estas propiedades, con la salvedad de su apolaridad, que limita su poder solvente para sustancias polares; tiene una presión y temperatura crítica relativamente bajas (tabla 1.2). Los procesos de extracción que emplean CO<sub>2</sub> supercrítico están diseñados para extraer sustancias naturales a bajas temperaturas, recirculando el gas, y dejando compuestos puros libres de cualquier residuo contaminante.<sup>35</sup>

Una de las propiedades del CO<sub>2</sub> por sobre sus puntos críticos de presión y temperatura, es extraer en forma selectiva los componentes solubles de una materia prima. El CO<sub>2</sub> es el solvente más usado debido a sus ventajas prácticas, las que incluyen su carácter no-tóxico, no inflamable, seguro para el ambiente, de gran disponibilidad, de bajo costo a alta pureza y su conveniencia para extraer compuestos termolábiles y compuestos de baja volatilidad y polaridad.<sup>36</sup>

**Tabla 1. 2** Propiedades del dióxido de carbono

Propiedades del CO <sub>2</sub>	
<b>Peso molecular</b>	44 g/mol
<b>Densidad del gas (15 °C, 1 atm)</b>	1,87 Kg/m <sup>3</sup>
<b>Densidad del gas (0 °C, 1 atm)</b>	1,97 Kg/m <sup>3</sup>
<b>Presión crítica</b>	73,8 bar
<b>Temperatura crítica</b>	31 °C
<b>Gravedad específica (0 °C, 1 atm)</b>	1,529

Fuente: Mendiola<sup>35</sup>

### 1.5.2 Extracciones con Fluidos supercríticos.

La extracción supercrítica y el fraccionamiento de la materia natural han sido las aplicaciones más estudiadas en el campo de los fluidos supercríticos en los últimos 10 años, los estudios sobre la extracción de compuestos clásicos como aceites esenciales y semillas de diversas fuentes: semillas, frutos, hojas, flores, rizomas, etc., con o sin la adición de un co-disolvente se han publicado. Extracciones con CO<sub>2</sub> como solvente supercrítico en la obtención de antioxidantes, productos farmacéuticos, colorantes y pesticidas nos revelan su elevado potencial en el sector industrial, ya que es usado en procesos como: descafeinización de café y té, eliminación de grasa de alimentos, obtención de extractos herbales y aromáticos, eliminación de contaminantes de alimentos, etc. (ver Tabla 1.3).<sup>33,37</sup>

**Tabla 1. 3** Compuestos extraídos con fluidos supercríticos

Materia prima	Principio Activo	Condiciones de extracción		Rendimiento (%)	Fuente
		T (°C)	P (bares)		
Microalga <i>spirulina platensis</i>	antioxidantes	75	320	0,85	Mendiola <sup>35</sup>
semillas de guayaba	fenoles	50	300	1,39	Castro et al. <sup>38</sup>
Nuez	aceite esencial	32	200	1,63	Yoda et al. <sup>39</sup>
semillas de cilantro	antioxidantes	48	178	1,98	Yépez et al. <sup>40</sup>
pulpa de soya	aceite esencial	40	200	3,09	Quitain et al. <sup>41</sup>
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	antioxidantes	55	350	3,54	Hu et al. <sup>42</sup>
Uvilla	antioxidantes	60	400	3,6	Wu et al. <sup>43</sup>
grano de cacao	manteca de cacao	40	270	1,83	Marquina y Quintero <sup>44</sup>
grano de cacao	manteca de cacao	40	124	1,51	Zuriday <sup>45</sup>
germen de trigo	fenoles	44	510	8,95	Gelmez et al. <sup>46</sup>
Lavanda	antioxidantes	53	207	13,2	Danh et al. <sup>47</sup>
clavo de olor	aceite esencial	50	100	19,6	Guan et al. <sup>48</sup>

### 1.5.3 Descripción del equipo de extracción con Fluidos supercríticos.

La instrumentación necesaria para realizar una extracción con fluidos supercríticos es bastante simple. El sistema de extracción consiste en una bomba de alta presión, celda de extracción, zona de descompresión y sistema de colección de los analitos.<sup>49</sup>

El proceso consiste básicamente en cuatro etapas:

Presurización: se eleva la presión del gas por encima de su presión crítica; esto se realiza por medio de una bomba.<sup>32</sup>

Ajuste de temperatura: se remueve o se adiciona energía térmica, ya sea con un intercambiador, baños térmicos o resistencias eléctricas, para llevar el solvente a la temperatura de extracción requerida.<sup>32</sup>

Extracción: se conduce el solvente al extractor donde se encuentra la muestra que contiene el soluto de interés.<sup>32</sup>

Separación: el gas se descomprime a una presión inferior a la presión crítica, liberándose el soluto en el separador.<sup>32</sup>

## 1.6 Antioxidantes y polifenoles de *Theobroma cacao* L.

Los antioxidantes son sustancias que el organismo fabrica de forma natural o que se encuentran en los alimentos, capaces de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Son opuestos a radicales libres que son factores oxidantes, y a los que se relaciona con muchas enfermedades.<sup>50</sup> Los antioxidantes constituyen un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde algunas relativamente simples como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular como los taninos.<sup>51</sup>

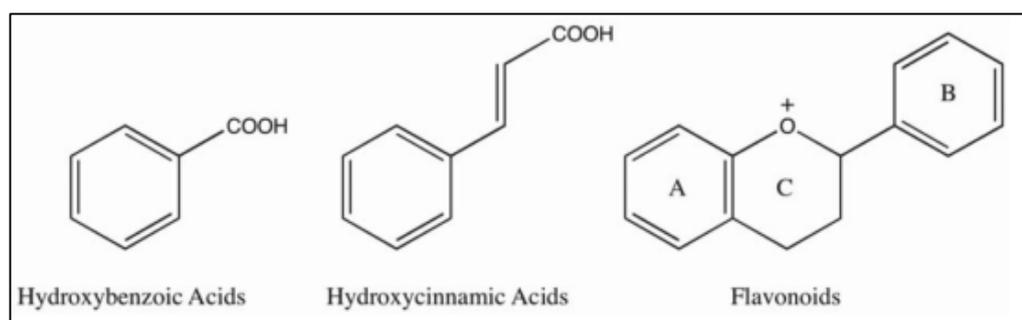
### Radicales libres

Un radical libre es un átomo o grupo de átomos que contienen por lo menos un electrón no apareado,<sup>52</sup> por lo que son muy reactivos, ya que tienden a captar un electrón de otros átomos con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica y generan reacciones en cadena provocando una agresión sobre células y tejidos.<sup>52</sup>

### Polifenoles

Los polifenoles constituyen uno de los grupos de metabolitos secundarios más numerosos en la naturaleza, y en los últimos años se les ha atribuido efectos beneficiosos ya que están involucrados en los mecanismos de defensa y prevención frente a agentes causantes de enfermedades asociadas al estrés oxidativo.<sup>53</sup> Sus posibles beneficios para la salud humana son actuar como anticancerígeno, antiaterogénico, anti-úlceras, antiinflamatorio, antitrombótico, inmunomodulador, antimicrobiano, vasodilatador y efectos analgésicos.<sup>54</sup>

Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos.<sup>55</sup> Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (ver estructuras en la figura 1.3).<sup>56</sup>

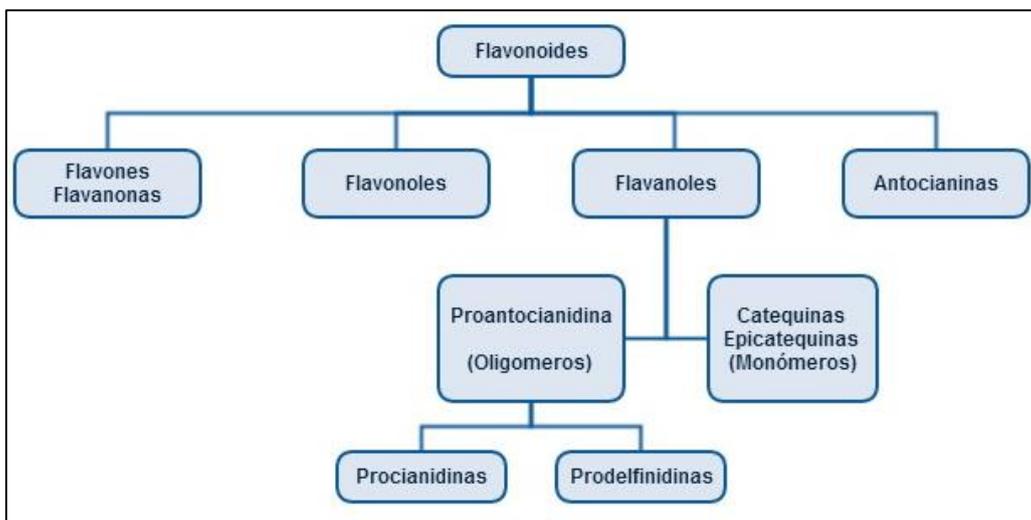


**Figura 1. 3** Estructuras básicas de ácidos fenólicos y flavonoides.

Fuente: Khoddami et al.<sup>28</sup>

Los flavonoides constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal, están constituidos por estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (figura 1.4).<sup>56-57</sup>

Los flavanoles más representativos en el cacao son de tipo flavan-3-ol: catequinas (37%), antocianinas (4%), y proantocianidinas (58%). La cantidad y tipo de polifenoles que contiene el cacao dependen de la planta de la que proceden y del método utilizado para su obtención.<sup>58</sup> A continuación se muestra una imagen del cuadro de la clasificación de los flavonoides:



**Figura 1. 4** Clasificación de los flavonoides.

Fuente: Parra<sup>57</sup>

### 1.7 Determinación de fenoles totales.

El método Folin-Ciocalteu es el que se usa para la determinación de fenoles totales. El reactivo que se usa está constituido por una mezcla de ácido fosfowolfrámico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio y molibdeno. La coloración azul producida posee una absorción máxima en torno a 765 nm y ésta es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos. Los resultados se expresan en mg de ácido gálico por 100 g muestra analizada.<sup>59</sup>

### Determinación de capacidad antioxidante.

Existen diversos métodos para evaluar la capacidad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Los más usados son el FRAP, basado en la capacidad de reducción férrica y los de ABTS, DPPH y ORAC, basados en la captación de distintos radicales libres; éstas técnicas son utilizadas para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos que contienen los frutos

para captar los radicales libres generados, operando así contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación.<sup>60</sup>

### **Método del ABTS**

El radical ABTS se genera a partir de su precursor el ácido 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolín-6- sulfónico) (ABTS). El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible<sup>61</sup>.

El fundamento de este método consiste en observar la decoloración del radical ABTS debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno.<sup>62</sup>

### **Método FRAP**

Es uno de los métodos más utilizados, describe la habilidad reductiva del ión férrico. Consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593 nm (azul) que se desarrolla cuando el complejo TPTZ-Fe<sup>+3</sup> se reduce a TPTZ-Fe<sup>+2</sup>.<sup>63</sup> Cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de (TPTZ-Fe<sup>+2</sup>) por lo tanto es más alta la señal de absorbancia.<sup>64</sup>

### **Método DPPH**

Este método se basa en el resultado de la medición de la reducción de las sustancias evaluadas medidas a 515 nm del radical DPPH empleando la técnica espectrofotométrica.<sup>65</sup> La concentración de DPPH en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. De esta forma, se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos OH activos donadores de hidrógeno, capaces de capturar los radicales libres.<sup>66</sup>

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 2.1 Materiales.

### Reactivos

**Extracción de fluidos supercríticos:** CO<sub>2</sub> grado alimento (pureza 99,9 %) (INDURA), etilenglicol (LAQUIN S. A).

**Fenoles Totales:** Folín-Ciocalteu 2N (Sigma-Aldrich), carbonato de sodio (Merck), ácido gálico (Sigma), metanol y etanol absoluto (Panreac Química S. A).

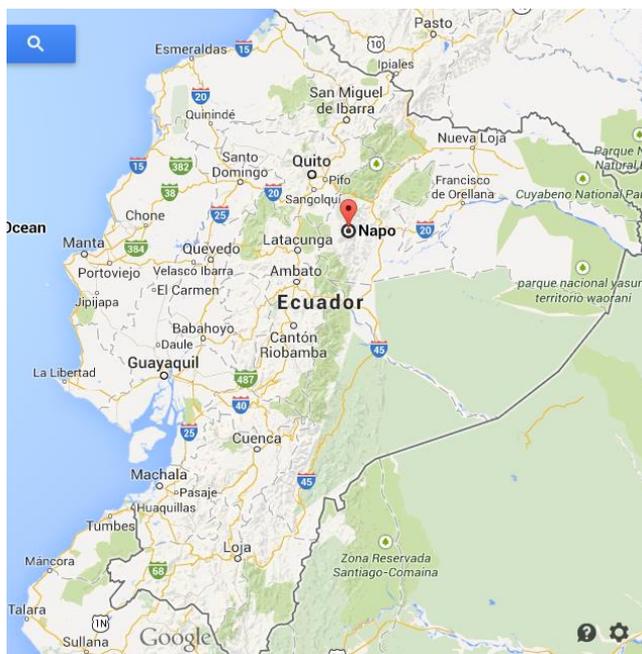
**ABTS:** 2,2-azino-bis (3 - etilbenzotiazolín - 6 - sulfónico) (Sigma), persulfato de potasio (Sigma- Aldrich), (ácido 6 - hidroxí - 2, 5, 7, 8- tetrametilcromo- 2- ácido carboxílico) Trolox (Aldrich Chemistry).

**FRAP:** 2, 4, 6 - tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Sigma), acetato de sodio trihidratado (Merck), ácido clorhídrico (Sigma-Aldrich), cloruro férrico hexahidratado (Merck).

**DPPH:** 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (Sigma), (ácido 6- hidroxí-2, 5, 7, 8- tetrametilcromo- 2- ácido carboxílico) Trolox (Aldrich Chemistry).

## 2.2 Muestras.

La materia prima utilizada fue la testa de la semilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) proveniente de la Fundación Kallari ubicada en la provincia de Napo-Ecuador (figura 2.1).



**Figura 2. 1** Ubicación geográfica de Napo

Fuente: google maps.

### 2.3 Caracterización y preparación de la muestra.

La testa fue deshidratada (Figura 2.2) a una temperatura de 60 °C alrededor de 24 horas hasta una humedad del 4 % aproximadamente (Figura 2.3) según la norma INEN 0173.<sup>67</sup>



**Figura 2. 2** Secado de muestra en estufa

Fuente: La Autora



**Figura 2. 3** Cápsulas dentro de estufa

Fuente: La Autora

Se redujo el tamaño de la muestra en un molino eléctrico, luego se trituró en una licuadora, se tamizó y se recogió las fracciones correspondientes a un tamaño de partícula de  $>250 \leq 500 \mu\text{m}$  (Figura 2.4) y finalmente se almacenó en bolsas plásticas. En el Anexo 1 se puede ver un diagrama del proceso de preparación de la muestra.



**Figura 2. 4** Tamizado de muestra

Fuente: La Autora

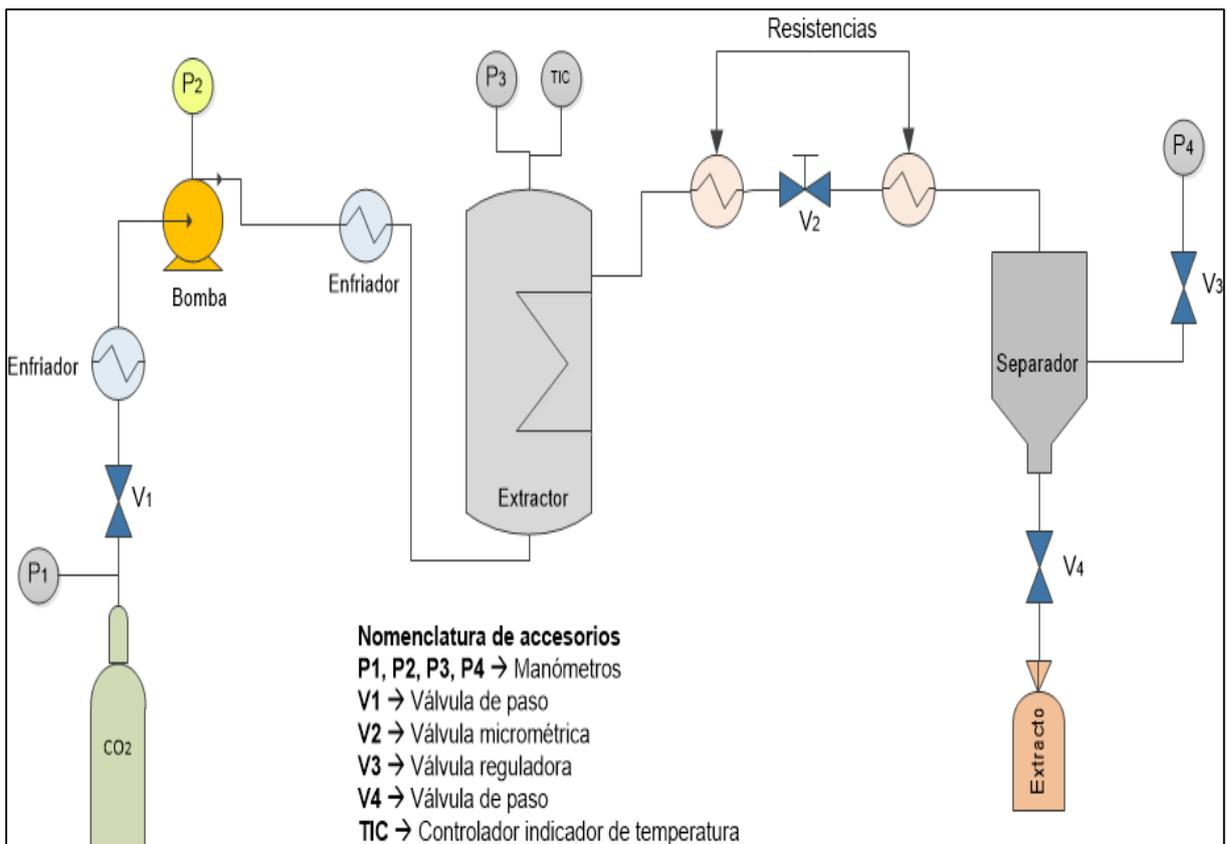
### 2.4 Obtención de extractos lipofílicos en equipo de fluidos supercríticos.

Las extracciones fueron realizadas a dos temperaturas (35 y 40 °C), y a dos presiones (150 y 200 bares), con un flujo de 10000 ml CO<sub>2</sub>/min durante 3 horas. Estas condiciones se definieron con anterioridad mediante ensayos previos.

En la figura 2.5 podemos apreciar las partes del equipo mediante un diagrama de flujo. Antes de realizar una extracción en el equipo, se verifica que la temperatura del baño

enfriador sea de -12 a -15 °C pues el disolvente debe ser sub-enfriado antes de la bomba, asegurando una fase líquida para evitar problemas de cavitación.

Se pesa entre 20 a 22 g de muestra para alimentación del extractor, el llenado ocupa un poco más de la mitad del volumen total del extractor; la muestra se mezcla con perlas de cristal para evitar la formación de grumos y lograr un buen contacto entre el CO<sub>2</sub> y las partículas de la muestra de testa de cacao cuando inicie el proceso de extracción. Se coloca el extractor dentro de la estufa (Figura 2.6).

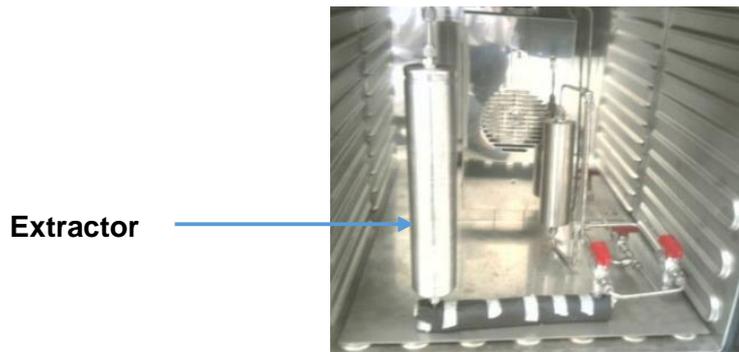


**Figura 2. 5** Diagrama de flujo del equipo de fluidos supercríticos

Fuente: Equipo de FSC del laboratorio de Alimentos de la UTPL

Elaboración: La Autora.

Se conecta correctamente las tuberías y controladores eléctricos. Se verifica que la temperatura establecida para el controlador (TIC) coincida con la temperatura del extractor, se abre la llave de la parte superior del cilindro para alimentar CO<sub>2</sub>, se controla que el manómetro (P<sub>1</sub>) registre mínimo 56 bares de solvente para abastecer al sistema la presión suficiente. Se enciende la bomba, y se la regula hasta que la presión de la misma (P<sub>2</sub>) y del extractor (P<sub>3</sub>) lleguen al valor deseado, luego se abre la válvula micrométrica (V<sub>2</sub>) situada antes del separador, con el objetivo de regular el flujo hasta que sea de 10 000 ml CO<sub>2</sub>/min.



**Figura 2. 6** Extractor dentro de estufa  
Fuente: La Autora.

Se revisa la temperatura de las resistencias ya que al abrir la válvula micrométrica el gas se expande adiabáticamente, y se produce variación en su temperatura por el efecto Joule-Thomson.

Una vez establecidas las condiciones de presión y temperatura, se abre la válvula de control manual ( $V_3$ ) para el gas comprimido, esta nos ayuda a fijar la presión del separador ( $P_4$ ) en 30 bares, pues a esta presión se logra separar el solvente del extracto sólido. Una vez estabilizado el equipo se inicia con las 3 horas de extracción.

A continuación en la figura 2.7 se presenta una fotografía del equipo de fluidos supercríticos con el que cuenta el laboratorio de Alimentos de la UTPL.



**Figura 2. 7** Fotografía del equipo de fluidos supercríticos.  
Fuente: La Autora.

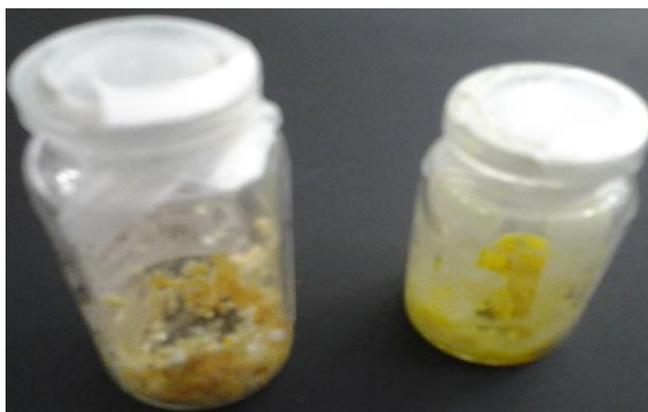
Culminada la extracción, se apaga la bomba, y se procede a cerrar la llave del cilindro de CO<sub>2</sub> para despresurizar el equipo a las mismas condiciones extracción con las que se trabajó.

El cálculo del rendimiento de extracción (Anexo 2) se hace tomando el peso inicial de muestra alimentada y del extracto obtenido, aplicando la siguiente formula:

$$R(\%) = \frac{\text{Peso extracto obtenido}}{\text{Peso de muestra inicial alimentada}} \times 100$$

## 2.5 Extracción Soxhlet.

Se realizó extracciones en el equipo soxhlet empleando hexano como solvente durante 3 horas, el peso de la muestra alimentada fue aproximadamente 8 gramos. El extracto obtenido puede verse en la figura 2.8.



**Figura 2. 8** Extracto de extracción supercrítica (izquierda) y soxhlet (derecha) de testa de cacao

Fuente: La autora.

## 2.6 Determinación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales fue determinado usando el método de Folin-Ciocalteu descrito por Thaipong et al.<sup>68</sup> Los extractos diluidos en metanol se sonicaron en el ultrasonido durante 2 horas aproximadamente, 150 µL de éstas muestras fueron colocadas en viales de 4 ml adicionando 2400 µL de agua y 150 µL de Folín Ciocalteu (0,25N); se agitó 5 min en el vortex luego añadimos 300 µL de carbonato de sodio y dejamos reposar 2 h en oscuridad. La absorbancia fue medida a 725 nm y comparada con una curva de calibración de ácido gálico. Los resultados se expresaron en mg equivalente de ácido gálico por 100

gramos de muestra (mg GAE/100g muestra). En el Anexo 1 se puede ver el esquema del proceso.

## **2.7 Determinación de capacidad antioxidante.**

### **2.7.1 Método ABTS.**

Para el ensayo ABTS utilizamos el procedimiento descrito por Arnao et al.<sup>69</sup> con ajustes descritos por Thaipong et al.<sup>68</sup> La solución patrón (SP) incluyó 7.4 mM de ABTS y 2.6 mM de persulfato de potasio, dejando que reaccionen por 12 h. La solución de trabajo (ST) fue preparada a partir de 1 ml de SP disuelto en 60 ml de metanol para obtener  $1,1 \pm 0,02$  de absorbancia a 734 nm. Los extractos de testa de cacao diluidos (150  $\mu$ L) se mezclaron con 2850  $\mu$ L de solución ABTS, reaccionaron por 2 h en la oscuridad, y se leyó su absorbancia a 734 nm. Se utilizó una curva estándar (25 – 600  $\mu$ M) de Trolox. El resultado se expresa en  $\mu$ mol equivalentes de Trolox/g muestra. Al final en el Anexo 1 se adjunta el diagrama del procedimiento.

### **2.7.2 Método DPPH.**

El método DPPH empleado es descrito por Brand-Williams et al.<sup>66</sup> con algunas modificaciones hechas por Thaipong et al.<sup>68</sup> La solución patrón (SP) fue preparada disolviendo 24 mg de DPPH en 100 ml de metanol y refrigerada a  $-20$  °C hasta antes de usar. La solución de trabajo (ST) se obtuvo al mezclar 10 ml de SP y 45 ml de metanol hasta ajustar su absorbancia de  $1,1 \pm 0,02$  leída a 515 nm. Los extractos de testa de cacao (150  $\mu$ L) y 2850  $\mu$ L de ST reaccionaron 24 h en la oscuridad, las absorbancias fueron leídas a 515 nm. La curva estándar tuvo una concentración entre (25 –800  $\mu$ M) de Trolox. El resultado se expresa en  $\mu$ mol equivalentes de Trolox/g muestra. Al final en el Anexo 1 se adjunta el diagrama del procedimiento.

### **2.7.3 Método FRAP.**

El ensayo FRAP utilizado fue acorde al procedimiento descrito por Benzie y Strain.<sup>63</sup> con modificaciones hechas por Thaipong et al.<sup>68</sup> La solución patrón incluye 300mM de buffer acetato pH 3,6; 10 mM TPTZ (2, 4, 6- tripiridil-s-triazina) disueltos en una solución de HCl 40 mM, and 20 mM de solución  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . La solución de trabajo se obtuvo mezclando y calentando a 37 °C: 25 ml de buffer acetato con 2,5 ml de solución TPTZ y 2,5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Finalmente se colocó 150  $\mu$ L de extractos diluidos y 2850  $\mu$ L de ST, éstos reaccionaron por 30 min y se leyó su absorbancia a 593 nm. Se empleó una curva estándar de (25 – 800  $\mu$ M) de trolox. El resultado se expresa en  $\mu$ mol equivalentes de Trolox/ g muestra. Al final en el Anexo 1 se adjunta el diagrama del procedimiento.

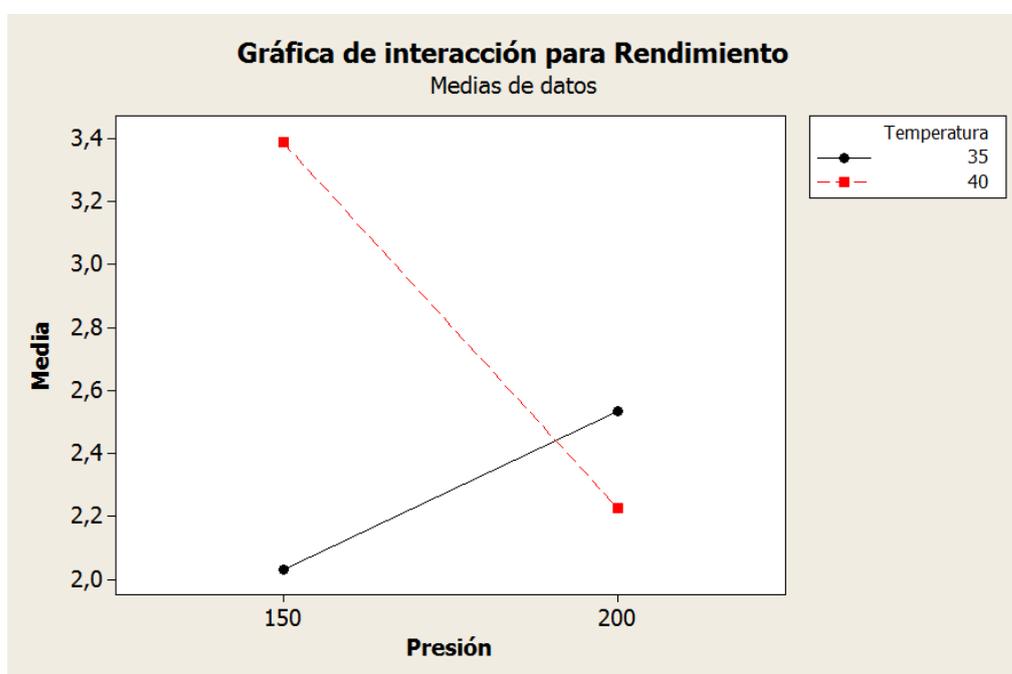
## **2.8 Método experimental**

Se utilizó un diseño factorial  $2^2$  con dos variables: 1) presión 150 y 200 bares; 2) temperatura 35 y 40 °C, cada experimento se realizó por triplicado, obteniendo un total de 12 fracciones. Los datos fueron analizados en el programa estadístico minitab, mediante un análisis ANOVA, con el fin de conocer el efecto de las condiciones de extracción sobre el rendimiento, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIONES**

### 3.1 Rendimientos de extracción

En la Figura 3.1 se puede apreciar que existe una relación directamente proporcional entre la temperatura de extracción y el rendimiento, pero una relación inversa entre presión y rendimiento. Se observa incremento del rendimiento sin embargo no existe diferencia significativa entre las condiciones evaluadas de presión y temperatura sobre el rendimiento de extracción, posiblemente el tiempo de extracción fue corto. Esto no concuerda con lo reportado por Quintero y Marquina<sup>44</sup> y Zuriday<sup>45</sup>, quienes afirman que al aumentar la presión, se incrementa la densidad del CO<sub>2</sub> y con ello la capacidad de disolver los compuestos de interés. Castro et al.<sup>38</sup>; Li y Hartland<sup>10</sup> y Mendiola<sup>35</sup> también obtuvieron un mayor rendimiento luego de incrementar presión.



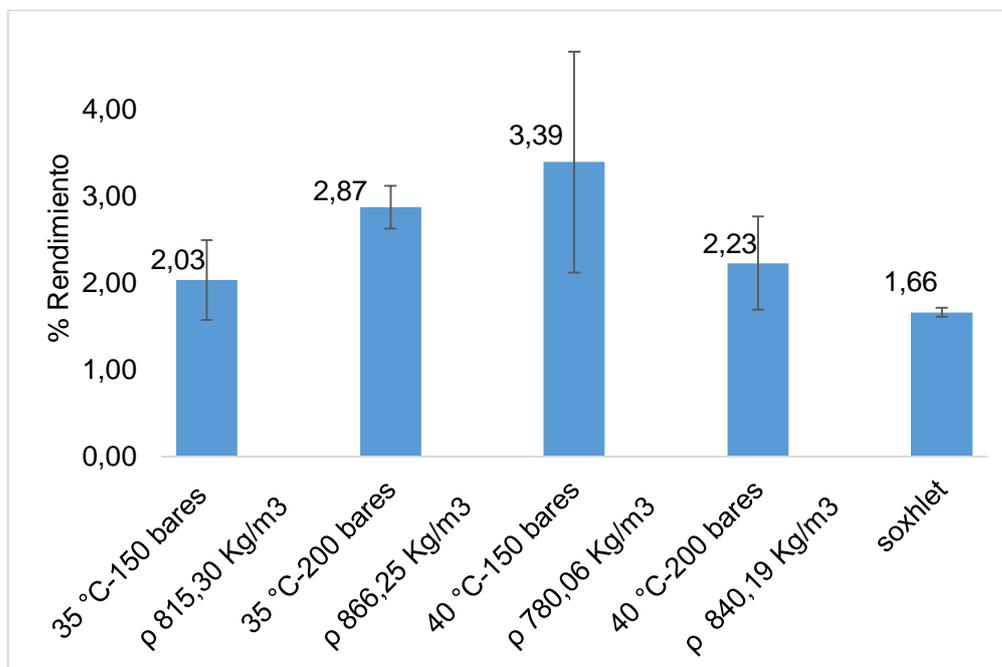
**Figura 3. 1** Interacción de presión y temperatura sobre el rendimiento.

Fuente: La Autora.

Se debe indicar que los rendimientos encontrados presentan un alto coeficiente de variación, lo que puede afectar el análisis de los resultados. Es importante mencionar que durante el proceso de extracción se tuvo todos los cuidados necesarios en cuanto a la fijación de las condiciones de operación y a pesar de esto, los coeficientes de variación se mantuvieron altos comprendidos entre 8,59 y 37,56. Este comportamiento también es reportado por los autores Mendiola<sup>35</sup>; Zuriday<sup>45</sup>; Quintero y Marquina<sup>44</sup> y Carpio<sup>70</sup>.

Los valores de rendimiento estuvieron comprendidos entre 2,03 a 3,39 % (Anexo 2), los cuales fueron mayores al resultado encontrado por el método soxhlet de 1,66 % (Anexo 3) como se muestra en la Figura 3.2.

Se escogió como mejores condiciones de extracción 200 bares y 35 °C, debido a que con estas condiciones se obtuvo mayor precisión, alcanzando un rendimiento de 2,87 % y una desviación menor en comparación a los demás tratamientos; este valor supera un 35 % la cantidad de extracto obtenido con el método soxhlet.



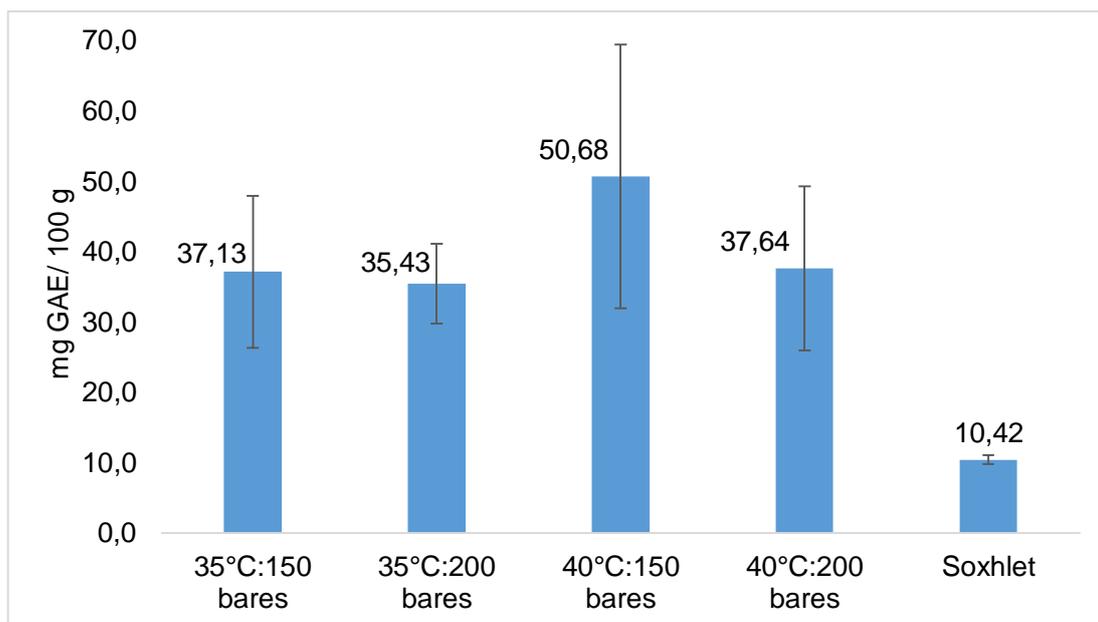
**Figura 3. 2** Comparación de rendimientos de extracción a diferentes condiciones

Fuente: La Autora.

Una de las ventajas que se puede destacar de la técnica de fluidos supercríticos es que el extracto se encuentra puro, contrario a la técnica soxhlet donde el solvente siempre deja un residuo inseparable en el producto, particularmente cuando se realiza con hexano, que es el disolvente más usado como lo menciona Velasco et al.<sup>9</sup>

### 3.2 Cuantificación de fenoles totales

Los resultados de fenoles totales se encontraron en un rango de 37,13 a 50,68 mg GAE/100 g (Anexo 2), los cuales son mayores a la concentración encontrada utilizando el método soxhlet como se observa en la Figura 3.3, esto se debe a que el CO<sub>2</sub> se comporta como líquido y gas simultáneamente al alcanzar su presión y temperatura crítica, de modo que tiene mayor contacto con la muestra y logra captar los compuestos de interés, esto no sucede con el hexano que es el solvente usado en extracción soxhlet.



**Figura 3. 3** Comparación de las concentraciones de fenoles totales.

Fuente: La Autora

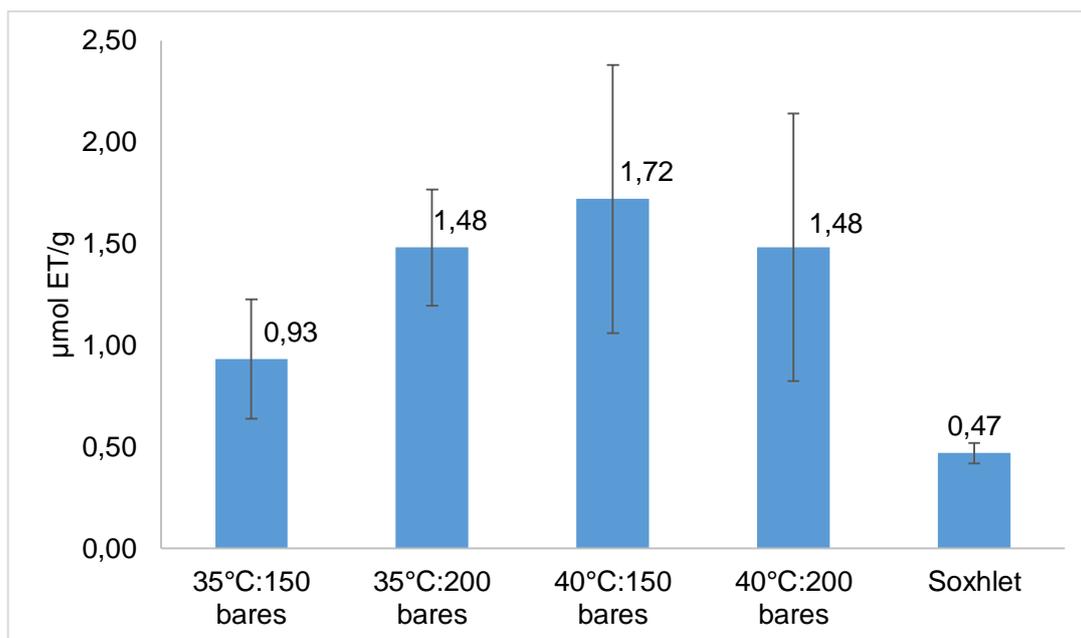
Las condiciones de extracción analizadas no muestran efecto significativo ( $P > 0,05$ ) sobre el contenido de fenoles totales de cada tratamiento, por tal motivo se seleccionó como mejores condiciones: 35 °C y 200 bares; las mismas que reportan un contenido de fenoles totales de 35,43 mg GAE/100 g. Según los autores Castro et al.<sup>38</sup>; Murga et al.<sup>71</sup> y Goli et al.<sup>72</sup> se obtiene mayor concentración fenólica al incrementar la presión y disminuir la temperatura; esto no ocurrió en nuestro caso.

La concentración fenólica de los extractos lipofílicos de testa de cacao obtenidos en la extracción supercrítica, es menor a la reportada por Martínez et al.<sup>5</sup> cuyos valores van desde 80,17 a 144,83 mg GAE/100g hallados la fracción hidrofílica de testa de cacao. Así mismo Chávez y Ordoñez<sup>73</sup> indican concentraciones de fenoles totales mayores en extracción hidroalcohólica de durante el procesamiento de licor y polvo de cacao (4871-5675 mg GAE/g muestra).

### 3.3 Determinación de capacidad antioxidante

#### 3.3.1 Método ABTS.

Los resultados cuantificados por el método ABTS de la testa de cacao se aprecian en la figura 3.4, estos valores van desde 0,93 a 1,72  $\mu\text{mol ET/g}$  (Anexo 2). El análisis estadístico indica que no hay efecto de la condiciones de extracción sobre la concentración de capacidad antioxidante.



**Figura 3. 4** Concentraciones de capacidad antioxidante por método ABTS.

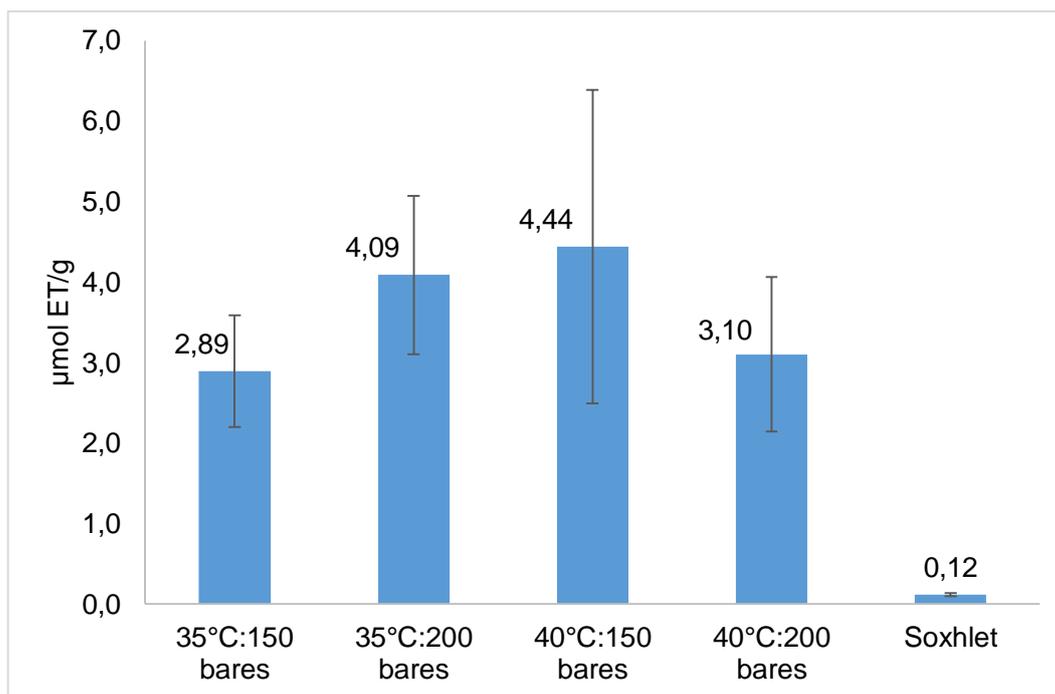
Fuente: La Autora.

Se eligió las condiciones de 35 °C y 200 bares como la mejor condición, debido a que con estas condiciones se obtuvo mayor estabilidad, esto se demuestra al observar un bajo coeficiente de variación (19,26 %) respecto de los demás comprendidos entre 19,26 - 44,40 %. Este valor no tiene el mismo efecto reportado por Hu et al.<sup>42</sup> donde hubo un incremento de la capacidad antioxidante al trabajar con valores altos de presión, tiempo y temperatura.

Con todos los tratamientos se obtuvo mayor capacidad antioxidante si se compara con el resultado alcanzado con el método soxhlet, con un valor 2 veces mayor a las condiciones de 35 °C-150 bares y 40 °C-200 bares; 3 veces mayor a 35 °C-200 bares y 4 veces mayor a 40 °C-150 bares.

### 3.3.2 Método DPPH.

En el ensayo DPPH empleado para medir la capacidad antioxidante, se indica valores entre 2,89 a 4,44 μmol ET/g (Anexo 2) mostrados en la figura 3.5. Los valores no presentan diferencias significativas a las condiciones trabajadas (Anexo 4), pero favorecen en todos los tratamientos con más del 300 % la concentración antioxidante de los extractos obtenidos con fluidos supercríticos comparados para el proceso soxhlet.



**Figura 3. 5** Concentraciones de capacidad antioxidante por método DPPH.

Fuente: La Autora.

El mejor tratamiento seleccionado fue 35 °C y 200 bares, atribuido su alta concentración de capacidad antioxidante (4,09 μmol ET/g) y a su coeficiente de variación menor con respecto a las demás condiciones; estos están comprendidos desde 23,94 hasta 43,88 %.

Los resultados de testa de cacao en el método DPPH, no concuerdan con lo mencionado por Mendiola<sup>35</sup>, quien al realizar el mismo ensayo en la obtención de compuestos bioactivos a partir de microalgas señala que la capacidad antioxidante mejora a 78 bares y 55 °C.

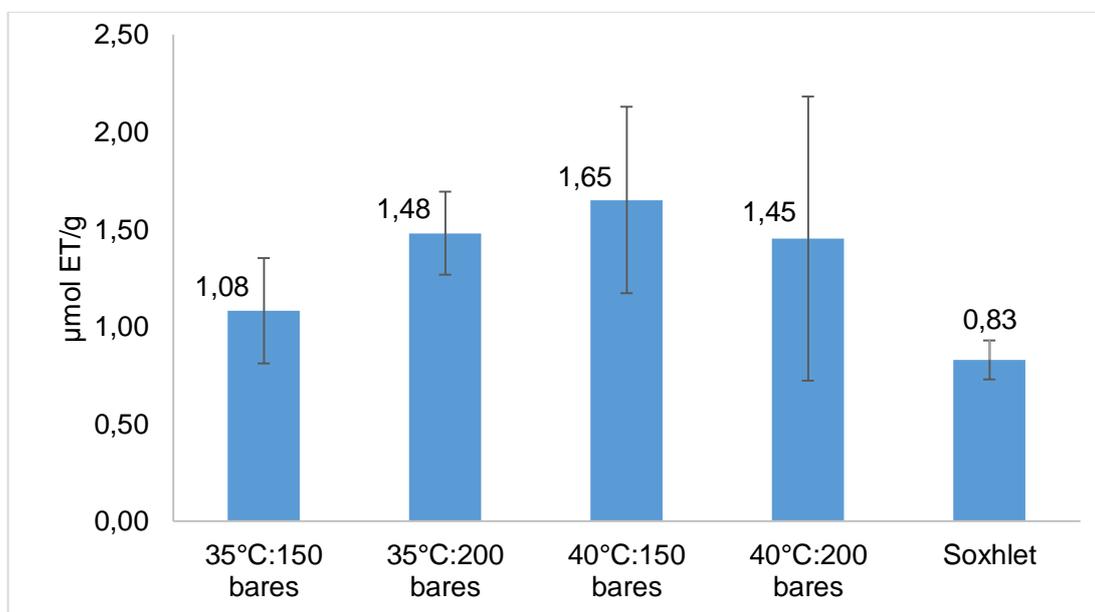
En el ensayo DPPH, se puede apreciar que la fracción obtenida con fluidos supercríticos supera en gran cantidad la concentración hallada para el proceso soxhlet, verificando de este modo que los fluidos supercríticos poseen gran poder disolvente para extraer compuestos de interés y de maximizar la capacidad antioxidante de las fracciones estudiadas, generando mayores ventajas frente al proceso soxhlet que a más de usar solventes que contaminen el extracto, reporta valores menores.

### 3.3.3 Método FRAP.

En la Figura 3.6 se representan los valores de capacidad antioxidante obtenidos en el ensayo FRAP, los mismos que varían entre 1,08-1,65 μmol ET/g.

La capacidad antioxidante obtenida en todos los tratamientos es considerablemente mayor al proceso soxhlet: en un 30 % a condiciones de 150 bares y 35 °C; 78 % a condiciones de

200 bares y 35 °C; 98 % a 150 bares y 40 °C; 75 % a condiciones de 200 bares y 40 °C. Sin embargo los resultados no presentan diferencias significativas para este ensayo. Estos resultados no concuerdan con lo citado por Wu et al.<sup>43</sup> donde se indica que se obtiene mayores resultados con un aumento de presión.



**Figura 3. 6** Concentraciones de capacidad antioxidante por método FRAP

Fuente: La Autora.

La concentración de capacidad antioxidante según los métodos ABTS, DPPH y FRAP obtenida en este estudio, señala valores similares a los reportados por Martínez et al.<sup>5</sup> donde se analizó por los mismos métodos la fracción hidrofílica de la testa de cacao, alcanzando valores entre 2,56-4,56 μmol ET/g en el ensayo ABTS; 1,57-4,05 μmol ET/g en el ensayo de DPPH y 0,67-1,78 μmol ET/g de muestra en el ensayo FRAP. Sin embargo estos valores son inferiores si se comparan con la capacidad antioxidante de la guayaba (*Psidium guajava* L.) como lo menciona Rojas et al.<sup>60</sup>

#### **4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **4.1 CONCLUSIONES**

No hubo diferencias significativas entre las condiciones de presión y temperatura ( $P > 0,05$ ) sobre el rendimiento de extracción; pero a las condiciones de 200 bares y 35 °C se obtuvo el mayor valor que fue 2,87 %.

Las mejores condiciones de extracción fueron 200 bares y 35 °C, a estas condiciones la concentración de fenoles totales de la testa de cacao fue 35,43 mg GAE/ 100 g, la capacidad antioxidante según los métodos ABTS, DPPH y FRAP estuvo comprendida entre: 1,48; 4,09 y 1,48  $\mu\text{mol ET/g}$  respectivamente.

Con el método de extracción con fluidos supercríticos se obtiene mejores rendimientos, las concentraciones de fenoles totales y de capacidad antioxidante aumentan comparadas con el método soxhlet.

## 4.2 RECOMENDACIONES

- El CO<sub>2</sub> es muy empleado como solvente en extracción supercrítica, pero se recomienda estudiar la combinación con un co-solvente para mejorar su capacidad disolvente, maximizando la calidad de los extractos obtenidos.
- Realizar un análisis cromatográfico para identificar cuáles son los compuestos que se hallan presentes en las fracciones obtenidas.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Chin, E.; Miller, K.; Payne, M.; Hurst, W.; Stuart, D. Comparison of antioxidant activity and flavanol content of cacao beans processed by modern and traditional mesoamerican methods. *Herit. Sci.* **2013**, *1*, 9.
- (2) ANECACAO. Cacao Nacional <http://www.anecacao.com/es/cacao-nacional/> (accessed Jul 7, 2014).
- (3) Baena, L.; García, N. Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarillas de las semillas tostadas de *Theobroma Cacao* L. de una industria chocolatera colombiana., Universidad Tecnológica de Pereira, 2012, pp. 1–64.
- (4) Palacios, Á. Establecimientos de parámetros (físicos, químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (*Theobroma cacao* L.) producido en dos zonas identificadas al norte y sur del litoral ecuatoriano., Universidad Técnica de Manabí, 2008, p. 190.
- (5) Martínez, R.; Torres, P.; Meneses, M. A.; Figueroa, J. G.; Pérez, J. A.; Viuda, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Res. Int.* **2012**, *49*, 39–45.
- (6) Hurst, W.; Krake, S.; Bergmeier, S.; Payne, M.; Miller, K.; Stuart, D. Impact of fermentation, drying, roasting and dutch processing on flavan-3-ol stereochemistry in cacao beans and cocoa ingredients. *Chem. Cent. J.* **2011**, *5*, 53.
- (7) Ferguson, L. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat. Res.* **2001**, *475*, 89–111.
- (8) Martínez, S.; González, J.; Culebras, J.; Tuñón, M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **2002**, 271–278.
- (9) Velasco, R.; Villada, H.; Carrera, J. Aplicaciones de los fluidos supercríticos en la agroindustria. *Inf. Tecnológica* **2007**, *18*, 53–65.
- (10) Li, S.; Hartland, S. A new industrial process for extracting cocoa butter and xanthines with supercritical carbon dioxide. *JAOCs (Journal Am. Oil Chem. Soc.)* **1996**, *73*, 423–429.

- (11) Suazo, Y. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense., universidad pública de navarra, 2012, p. 50.
- (12) Dostert, N.; Roque, J.; Cano, A.; La Torre, M.; Weigend, M. *Hoja Botánica: Cacao*; 2012-06345; Lima, 2011; pp. 2–19.
- (13) Rodríguez, M.; Maldonado, P. Exportación de cacao en grano desde la asociación de agricultores agroecológicos Tsáchilas del Búa hacia Estados Unidos, mediante la creación de un centro de acopio en la comunidad, con el fin de promover el desarrollo social y económico de la zona., Escuela Politécnica del Ejército- Ecuador, 2012, pp. 5–229.
- (14) Gonzales, C. Jaimes, M. Desarrollo experimental del proceso para la obtención de jugo derivado del mucílago de cacao, Universidad Industrial de Santander, 2005, pp. 1–59.
- (15) Schmid, P. Análisis de la situación actual y perspectivas del cacao ecuatoriano y propuesta de industrialización local., Universidad Internacional del Ecuador, 2013, p. 130.
- (16) Recalde, A. Evaluación del efecto del pre-secado y tiempo de fermentación, en los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y ácidos volátiles en dos genotipos de cacao., Universidad Central del Ecuador, 2007, p. 80.
- (17) Belitz, H.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Química de Los Alimentos.*; Tercera ed.; Heidelberg, 2004; pp. 1–988.
- (18) Abarca, D.; Martínez, R.; Muñoz, J.; Torres, M.; Vargas, G. Residuos de café, cacao y cladodio de tuna: fuentes promisorias de fibra dietaria. *Rev. Tecnológica ESPOL* **2010**, *23*, 63–69.
- (19) Alemawor, F.; Dzogbefia, V.; Oddoye, E.; Oldham, J. Enzyme cocktail for enhancing poultry utilisation of cocoa pod husk. *Sci. Res. Essay* **2009**, *4*, 555–559.
- (20) Padrón, G.; Arias, E.; Romero, J.; Benavides, A.; Zamora, J.; García, S. Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso hortícola, propiedades físicas y de biodegradabilidad. *J. Mex. Chem. Soc.* **2004**, *48*, 156–164.

- (21) Ayeni, L. Effect of combined cocoa pod ash and npk fertilizer on soil properties, nutrient uptake and yield of maize (*Zea Mays*). *J. Am. Sci.* **2010**, *6*, 79–84.
- (22) Perea, J.; Ramirez, O.; Villamizar, A. Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano. *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial* **2011**, *9*, 35–42.
- (23) Betancourt, L.; Llano, J. Extracción de pectinas a partir de los subproductos del beneficio del cacao., Universidad EAFIT, 2009, pp. 1–50.
- (24) Barazarte, H.; Sangronis, E.; Unai, E. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2008**, *58*, 64–70.
- (25) Peredo, H.; García, E.; López, A. Aceites Esenciales: Métodos de Extracción. *Temas Sel. Ing. Aliment.* **2009**, *1*, 24–32.
- (26) Pena, M. Desarrollo de nuevas metodologías de preparación de muestra para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices medioambientales y alimentarias., Universidad Santiago de Compostela, 2010, pp. 5–193.
- (27) Caldas, A. Optimización escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido, Universidad de Cuenca, 2012, pp. 1–48.
- (28) Khoddami, A.; Wilkes, M.; Roberts, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules* **2013**, *18*, 2328–2375.
- (29) Esquivel, M.; Bernardo, M. El Uso de fluidos supercríticos en la industria de aceites alimentarios. *Grasas y Aceites* **2010**, *44*, 1–5.
- (30) Cerón, I.; Higuera, J.; Cardona, C. Capacidad antioxidante y contenido fenólico total de tres frutas cultivadas en la región andina. *Vector* **2011**, *5*, 17–26.
- (31) Martínez, J. *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*; Martínez, J., Ed.; United States., 2008; p. 367.
- (32) Velásquez, Á. M. *La tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial \**, 2008; pp. 2–7.
- (33) Domínguez, L.; Parzanese, M. Tecnologías para la industria alimentaria fluidos supercríticos. *Aliment. Argentinos- Una elección Nat.* **2013**, 1–12.

- (34) Vázquez, L. Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales., Universidad Autónoma de Madrid, 2008, p. 215.
- (35) Mendiola, J. Extracción de compuestos bioactivos de microalgas mediante fluidos supercríticos., Universidad Autónoma de Madrid, 2008, p. 138.
- (36) Silva, S. Optimización del proceso de extracción supercrítica de los polifenoles de la vaina de tara (*Caesalpinia spinosa*), Universidad de Chile, 2012, pp. 1–49.
- (37) Reverchon, E.; Marco, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *J. Supercrit. Fluids* **2006**, *38*, 146–166.
- (38) Castro, H.; Rodríguez, L.; Ferreira, S.; Parada, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium Guajava* L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. *J. Supercrit. Fluids* **2010**, *51*, 319–324.
- (39) Yoda, S.; Marques, M.; Petenate, A.; Meireles, M. Supercritical fluid extraction from *stevia rebaudiana bertonii* using CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + water: extraction kinetics and identification of extracted components. *J. Food Eng.* **2003**, *57*, 125–134.
- (40) Yepez, B.; Espinosa, M.; López, S.; Bolaños, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilib.* **2002**, *194-197*, 879–884.
- (41) Quitain, A.; Oro, K.; Katoh, S.; Moriyoshi, T. Recovery of oil components of okara by ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction. *Bioresour. Technol.* **2006**, *97*, 1509–1514.
- (42) Hu, Q.; Pan, B.; Xu, J.; Sheng, J.; Shi, Y. Effects of supercritical carbon dioxide extraction conditions on yields and antioxidant activity of chlorella pyrenoidosa extracts. *J. Food Eng.* **2007**, *80*, 997–1001.
- (43) Wu, S.; Tsai, J.; Chang, S.; Lin, D.; Wang, S.; Huang, S.; Ng, L. Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *physalis peruviana*. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 407–413.
- (44) Quintero, M.; Marquina, G. Evaluación del método de extracción supercrítica utilizando CO<sub>2</sub> en la obtención de manteca de cacao. *ANALES* **2002**, *2*, 91–104.

- (45) Zuriday, S. Extracción de manteca a partir de las semillas del cacao (*Theobroma cacao* L.) utilizando dióxido de carbono en condiciones supercríticas como solvente., Universidad Central de Venezuela, 2007, p. 129.
- (46) Gelmez, N.; Kincal, N. S.; Yener, M. E. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from roasted wheat germ based on yield, total phenolic and tocopherol contents, and antioxidant activities of the extracts. *J. Supercrit. Fluids* **2009**, *48*, 217–224.
- (47) Danh, L. T.; Triet, N.; Han, L. T. N.; Zhao, J.; Mammucari, R.; Foster, N. Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Supercrit. Fluids* **2012**, *70*, 27–34.
- (48) Guan, W.; Li, S.; Yan, R.; Tang, S.; Quan, C. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. *Food Chem.* **2007**, *101*, 1558–1564.
- (49) Valverde, A. *Extracción con fluidos supercríticos; principios y aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas*; 2002; Vol. 78, pp. 141–154.
- (50) Guerra, J. Estrés Oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna* **2001**, *18*, 326–335.
- (51) Juárez, M.; Olano, A.; Morais, F. Alimentos Funcionales. In *Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología*; España; pp. 167–201.
- (52) Maldonado, O.; Jiménez, E.; Guapillo, M.; Ceballos, G.; Méndez, E. Radicales libres y su papel en las enfermedades. *Rev. Médica la Univ. Veracruzana* **2010**, 33–39.
- (53) Granado Serrano, A. Estudios de los mecanismos de acción molecular de polifenoles de la dieta en cultivos celulares y animales de experimentación., Universidad Complutense de Madrid, 2010, pp. 1–195.
- (54) Hii, C.; Law, C.; Suzannah, S.; Misnawi; Cloke, M. Polyphenols in Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian J. Food Agro-Industry* **2009**, *2*, 702–722.
- (55) Calle, S. “Determinación analítica de la cafeína en diferentes productos comerciales”, Universidad Politécnica de Cataluña, 2011, pp. 1–105.

- (56) Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* **2012**, *27*, 76–89.
- (57) Parra, G. Farmacología de La (-)-epicatequina, Universidad Veracruzana, 2012, pp. 1–29.
- (58) Gil Quintero, J. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacao colombianos durante los procesos de pre e industrialización., Universidad de Antioquia, 2012, pp. 12–108.
- (59) Kuskoski, E.; Asuero, A.; Troncoso, A.; Mancini, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. e Technol. Aliment.* **2005**, *25*, 726–732.
- (60) Rojas, D.; Narváez, E.; Restrepo, L. *Evaluación del contenido de vitamina c, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (Psidium guajava L.) de las variedades Pera, Regional roja y Regional blanca*; Bogotá, 2008; pp. 49–62.
- (61) Prior, R.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 4290–4302.
- (62) Peláez, E. Actividad antioxidante del extracto en diclorometano de *palicourea guianensis* Aubl. (RUBIACEAE), Universidad Tecnológica de Pereira, 2009, p. 130.
- (63) Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76.
- (64) Sulbarán, B.; Sierra, E.; Ojeda, G.; Berradre, M.; Fernández, V.; Peña, J. Evaluación de la actividad antioxidante del tomate crudo y procesado. *Rev. Fac. Agron.* **2011**, *28*, 273–291.
- (65) Argüelles, L.; Hernández, I.; Méndez, D.; Méndez, P. *Evaluación de la capacidad antioxidante de alimentos preparados y bebidas típicas del estado de tlaxcala*; Tlaxcala, 2011; pp. 26–28.
- (66) Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30.
- (67) INEN. Cacao En Grano. Determinación de la Humedad. **1975**, *0173*, 1–3.

- (68) Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Hawkins Byrne, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 669–675.
- (69) Arnao, M.; Cano, A.; Acosta, M. The Hydrophilic and Lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* **2001**, *73*, 239–244.
- (70) Carpio, J. Subproductos de cacao como fuente de compuestos antioxidantes, Universidad Técnica Particular de Loja, 2014, p. 45.
- (71) Murga, R.; Sanz, T.; Beltra, S.; Cabezas, L. Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* **2002**, *23*, 113–121.
- (72) Goli, A.; Barzegar, M.; Sahari, M. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem.* **2005**, *92*, 521–525.
- (73) Chávez, R.; Ordoñez, E. Polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante (DPPH Y ABTS) durante el procesamiento de licor y polvo de cacao. *Rev. ECI Perú* **2013**, *10*, 42–49.

## ANEXOS

### ANEXO 1. ESQUEMAS DE METODOLOGÍA

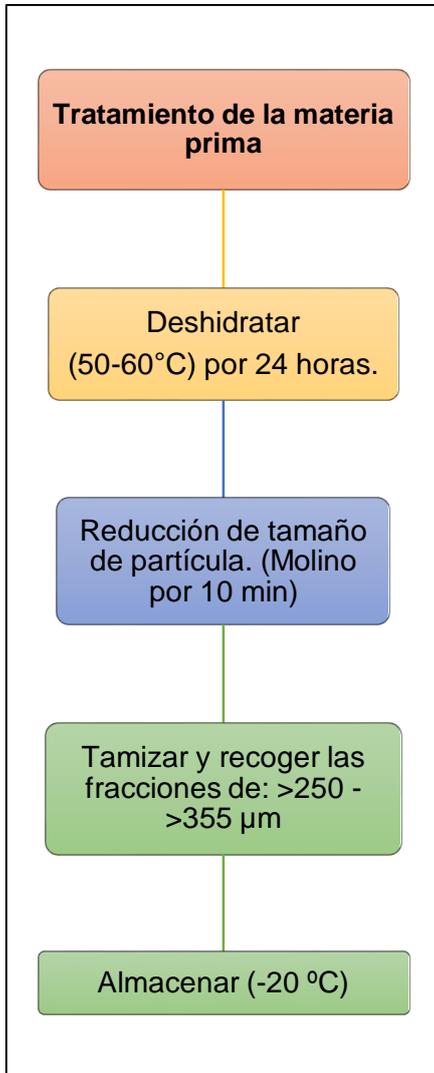


Figura 1. Preparación de la muestra

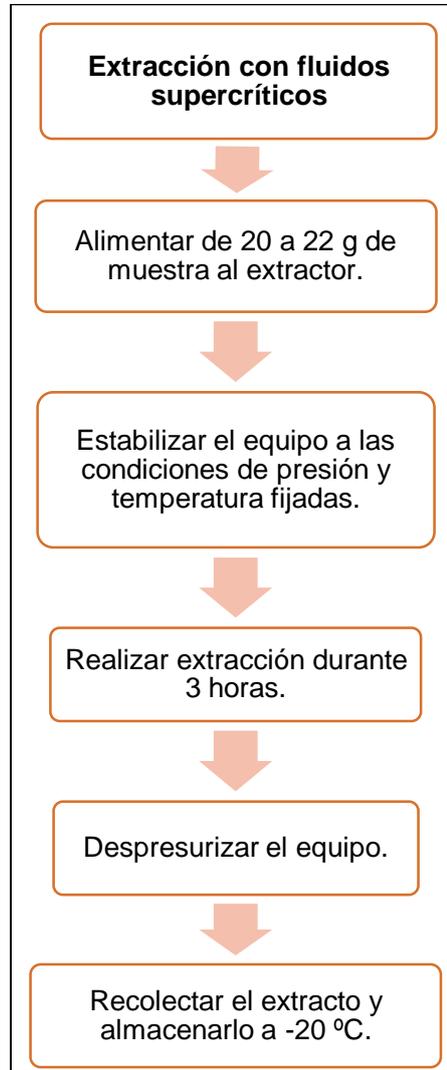
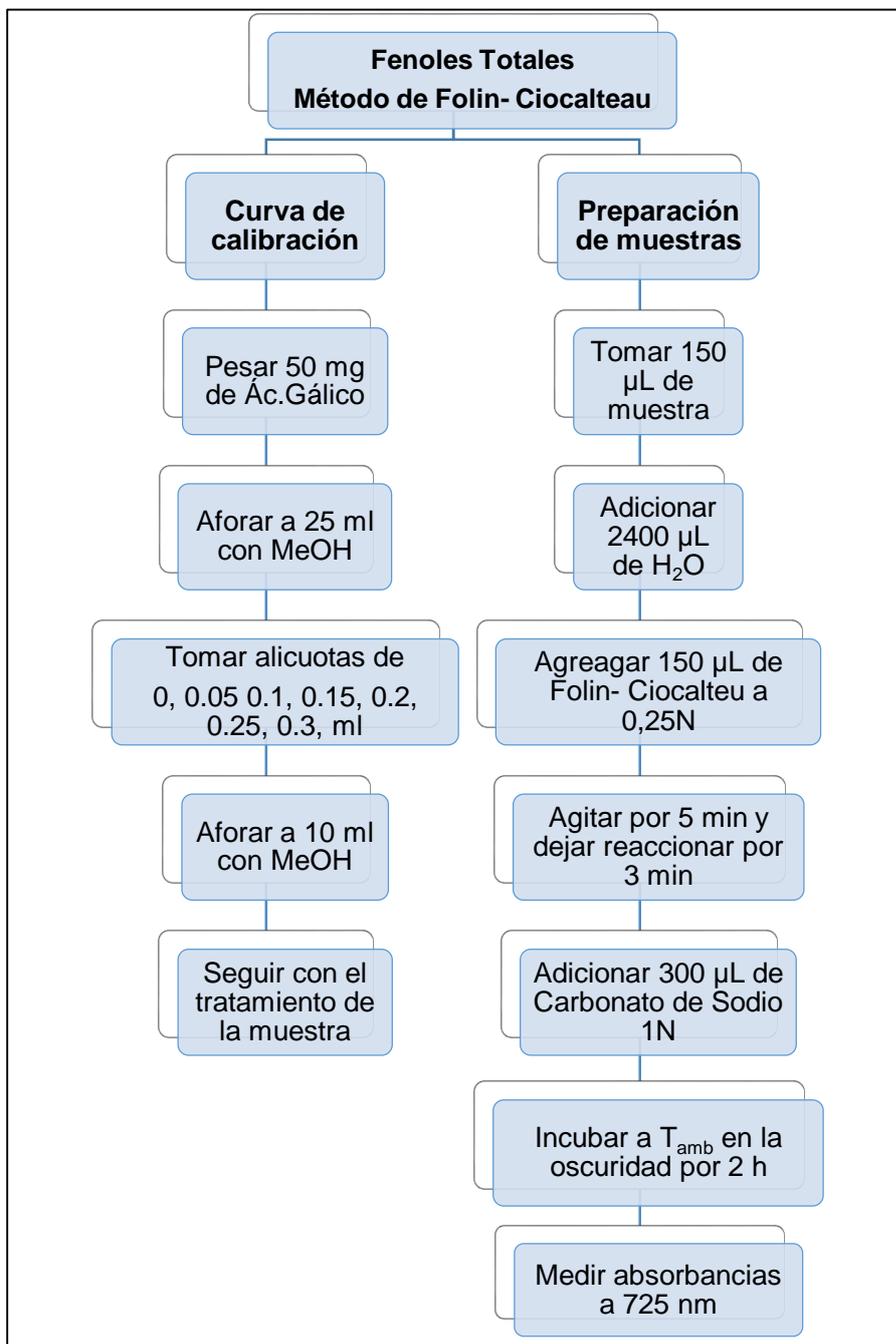
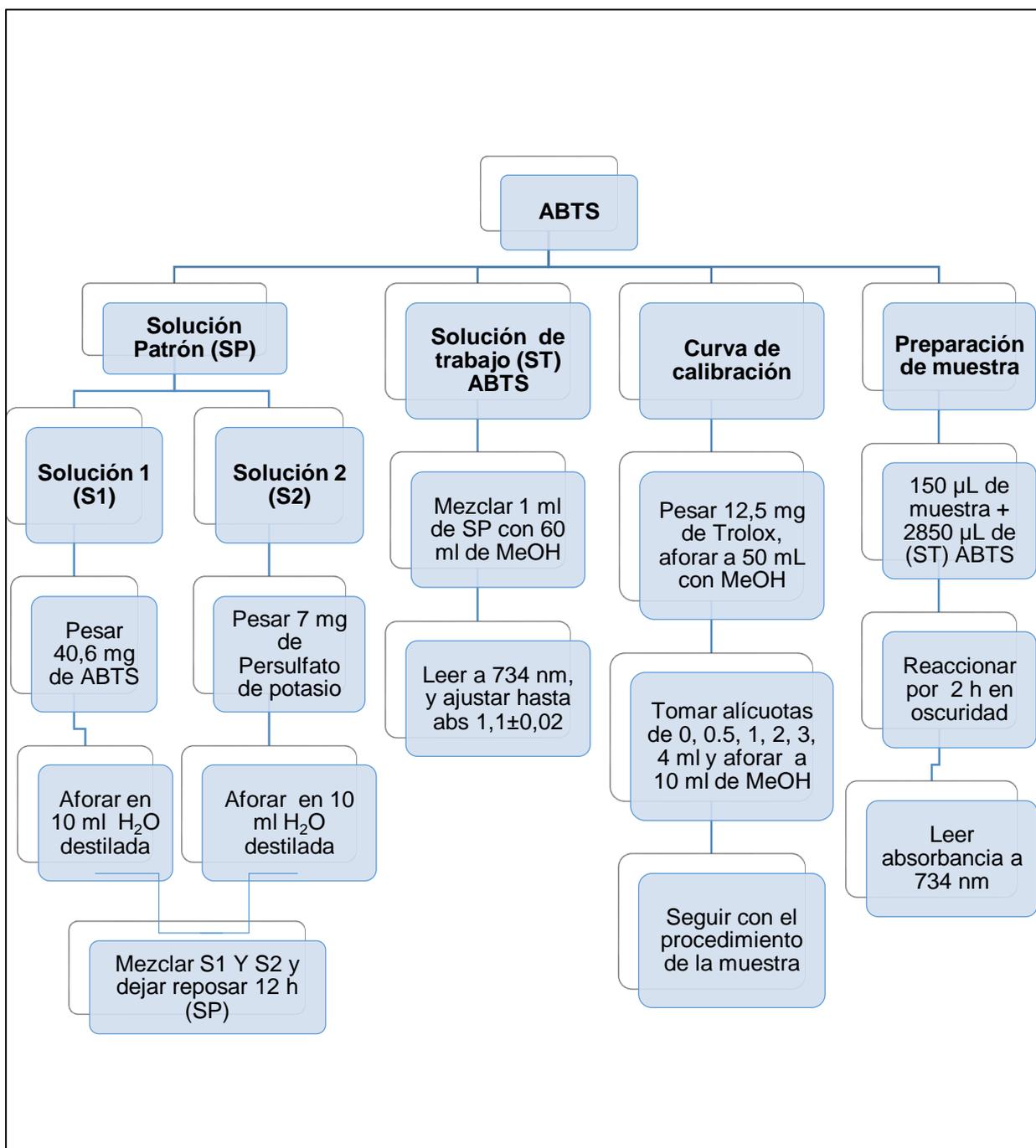


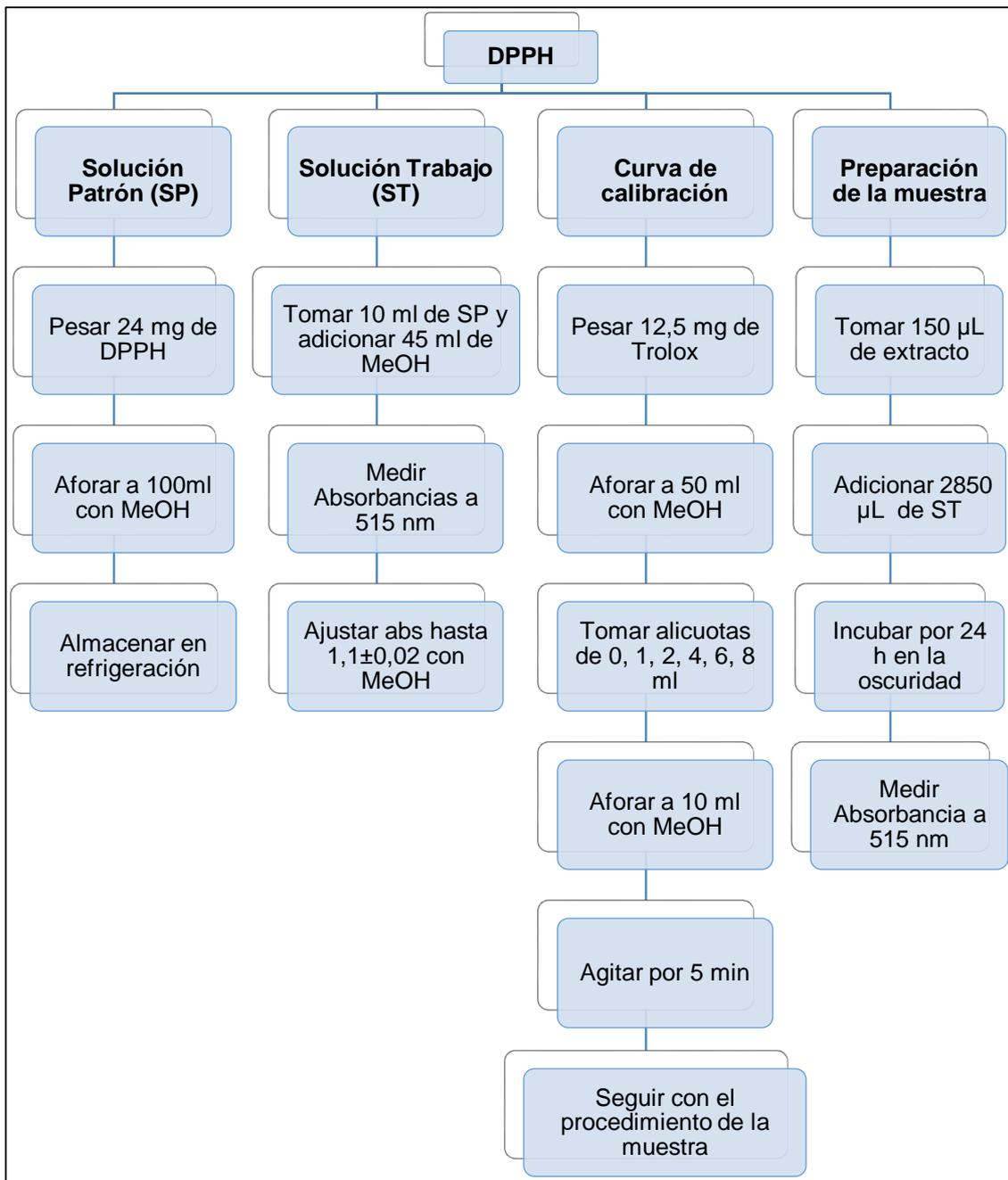
Figura 2. Proceso de extracción supercrítica



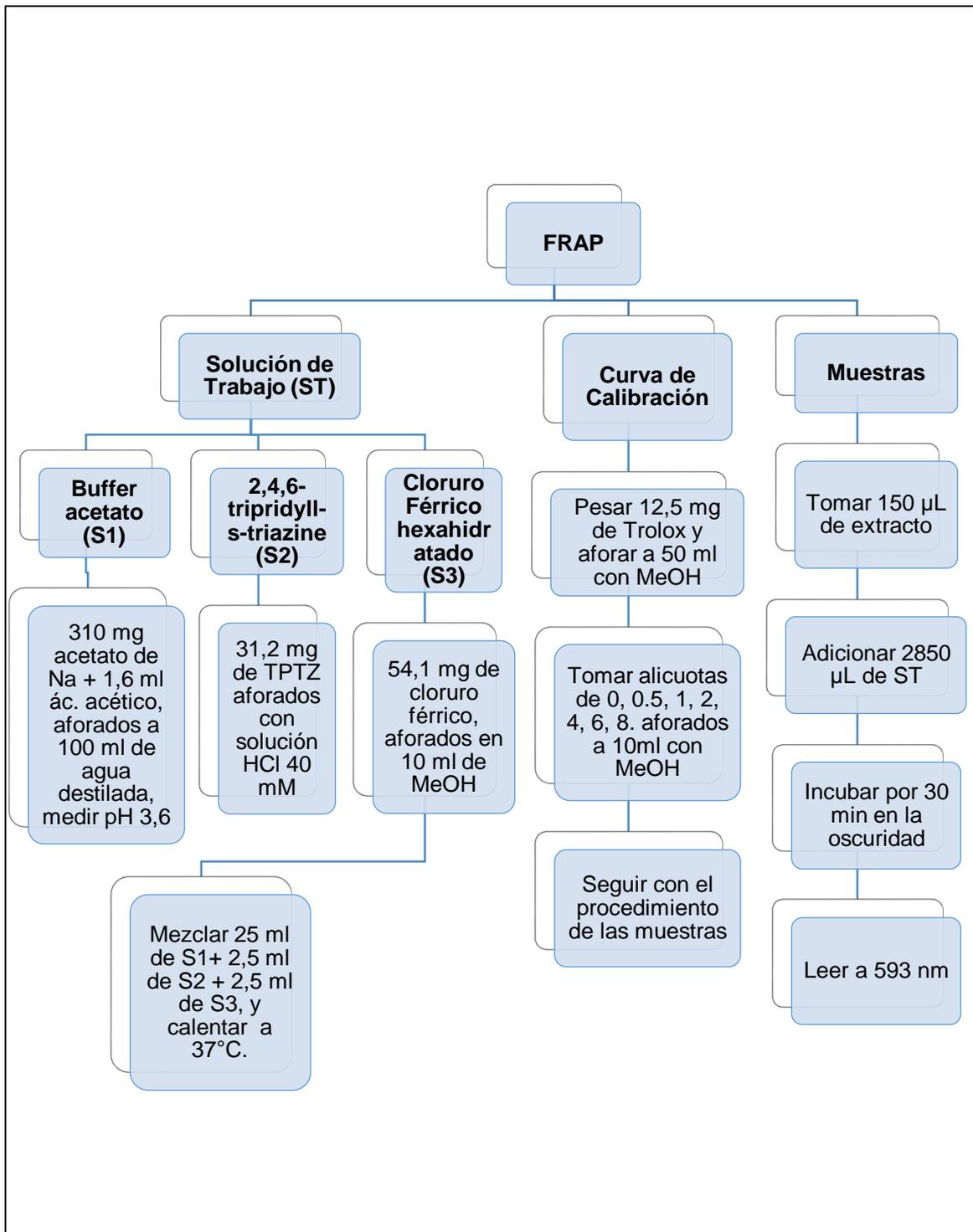
**Figura 3.** Procedimiento de fenoles totales.



**Figura 4.** Capacidad Antioxidante por el método ABTS.



**Figura 5.** Capacidad antioxidante por método DPPH.



**Figura 6.** Capacidad antioxidante por método FRAP.

## ANEXO 2. Resultados de extracción con fluidos supercríticos

### 2.1 Resultados de rendimiento

Tabla 2. 1 Rendimientos de extracción de fluidos supercríticos

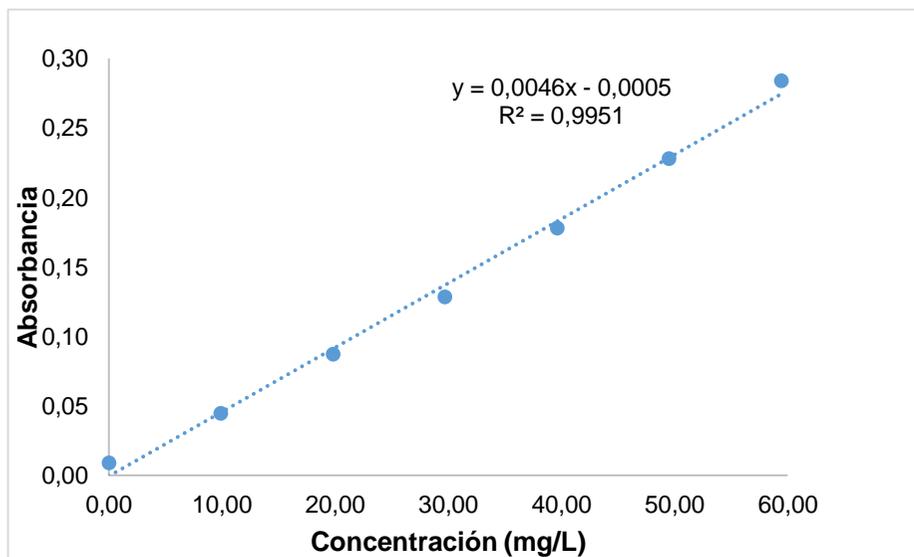
Rendimientos de extracción de la fracción lipofílica del cacao							
Condiciones		Muestra inicial (g)	Extracto obtenido (g)	Rendimiento %	Media	Desviación	Coef. Variación
T (°C)	P (bar)						
35	150	20,5581	0,3086	1,50	2,03	0,46	22,77
35	150	20,6360	0,4844	2,35			
35	150	21,0198	0,4730	2,25			
35	200	20,6494	0,5596	2,71	2,87	0,25	8,59
35	200	20,6567	0,7311	3,54			
35	200	20,1113	0,4749	2,36			
40	150	20,3307	0,9863	4,85	3,39	1,27	37,57
40	150	20,2290	0,5706	2,82			
40	150	20,2963	0,5080	2,50			
40	200	21,5529	0,3482	1,62	2,23	0,54	24,19
40	200	20,0202	0,4874	2,44			
40	200	21,5403	0,5668	2,63			

Cálculo de rendimiento
<p><b>Fórmula</b></p> $R(\%) = \frac{\text{Peso extracto obtenido}}{\text{Peso de muestra inicial alimentada}} \times 100$
<p>Ejemplo: E35T1-2</p> $R(\%) = \frac{0,4844}{20,6360} \times 100 = 2,347$

## 2.2 Cuantificación de fenoles totales

### Datos de curva de calibración

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	AG (mg/L)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0,00	0,009	0,009	0,009	0,01
0,05	10	9,9	0,044	0,045	0,044	0,04
0,1	10	19,8	0,086	0,088	0,087	0,09
0,15	10	29,7	0,128	0,128	0,129	0,13
0,2	10	39,6	0,177	0,178	0,179	0,18
0,25	10	49,5	0,228	0,228	0,228	0,23
0,3	10	59,4	0,284	0,283	0,284	0,28



### Determinación de concentración de fenoles totales

P. ácido gálico (g)	PM (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	C. Solución patrón (mg/L)
0,05	170	99	25	1980

Concentración de solución patrón

$$C = \left( \frac{0,05 \text{ g} \times 0,99}{25 \text{ ml}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) = 1980 \text{ mg/L}$$

### Concentración de estándares de curva de calibración

Fórmula  $\rightarrow C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$

Ejemplo  $\rightarrow$  Estándar con alícuota 0,05 ml

$$C_2 = \frac{1,980 \text{ mg/L} \times 0,05 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 9,9 \text{ mg/L}$$

### Concentración de extractos obtenidos

Ecuación de la curva de calibración  $\rightarrow y = 0,0046x - 0,0005$

$$x = \frac{y + 0,0005}{0,0046}$$

Ejemplo  $\rightarrow E35T1-1 \rightarrow y = 0,153 \rightarrow x = \frac{0,153 + 0,0005}{0,0046} = 33,442 \text{ mg/L}$

<b>1)</b> 33,44 $\rightarrow$ 1000 ml x $\leftarrow$ 4,14 ml x = 0,1385 mg	<b>2)</b> 0,1385 $\rightarrow$ 0,0083 g x $\leftarrow$ 0,30864 g x = 5,167 mg	<b>3)</b> 5,167 $\rightarrow$ 20,5581 g x $\leftarrow$ 100 g x = 25,13 mg GAE/100 g
--	---	---

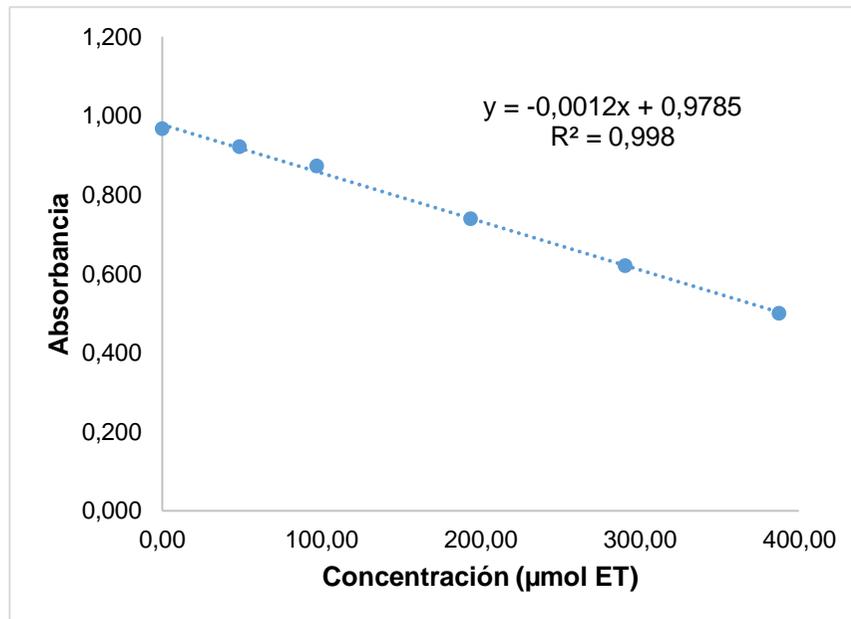
**Tabla 2. 2** Cuantificación de fenoles totales.

Condiciones		Absorbancia				Concentración (mg/L)	Extracto obtenido (g)	V. de MeOH a 2000 ppm(ml)	P. extracto a 2000 ppm (g)	Muestra (g)	Concentración (mg GAE/100 g)	Media	Desviación	Coef. Variación
T (°C)	P (bar)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio									
35	150	0,154	0,152	0,154	0,153	33,44	0,3086	4,14	0,0083	20,5581	25,13	37,13	10,81	29,11
35	150	0,179	0,18	0,181	0,180	39,24	0,4844	4,18	0,0084	20,6360	46,11			
35	150	0,164	0,165	0,162	0,164	35,69	0,4730	4,085	0,0082	21,0198	40,15			
35	200	0,112	0,113	0,113	0,113	24,60	0,5596	4,08	0,0082	20,6494	33,33	35,43	5,68	16,04
35	200	0,108	0,109	0,108	0,108	23,66	0,7311	4,16	0,0083	20,6567	41,87			
35	200	0,119	0,120	0,123	0,121	26,34	0,4749	4,11	0,0082	20,1113	31,10			
40	150	0,133	0,131	0,134	0,133	28,95	0,9863	4,22	0,0085	20,3307	70,14	50,68	18,77	37,03
40	150	0,160	0,160	0,160	0,160	34,89	0,5706	4,035	0,0081	20,2290	49,21			
40	150	0,120	0,120	0,119	0,120	26,12	0,5080	4,13	0,0083	20,2963	32,69			
40	200	0,142	0,139	0,141	0,141	30,69	0,3482	4,11	0,0082	21,5529	24,79	37,64	11,66	30,96
40	200	0,152	0,154	0,153	0,153	33,37	0,4874	4,08	0,0082	20,0202	40,62			
40	200	0,165	0,166	0,166	0,166	36,12	0,5668	4	0,0080	21,5403	47,52			

### 2.3 Determinación de capacidad antioxidante por método ABTS

#### Datos de curva de calibración

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	C. Trolox (µM)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0,00	0,967	0,968	0,966	0,967
0,5	10	48,44	0,920	0,921	0,922	0,921
1	10	96,89	0,873	0,874	0,873	0,873
2	10	193,78	0,739	0,741	0,740	0,740
3	10	290,66	0,620	0,619	0,621	0,620
4	10	387,55	0,501	0,501	0,499	0,500



#### Determinación de concentración de capacidad antioxidante

P. Trolox (g)	P. M (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	C. Solución patrón (µM)
0,0125	250,3	97	50	968,8761

Concentración de solución patrón

$$M = \frac{n}{v} = \frac{m}{PM} \cdot \frac{1}{v} = \frac{0,0125 \text{ g}}{\frac{250 \text{ g}}{\text{mol}}} \cdot \frac{1}{100 \text{ ml}} = 1 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M} \times \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \text{ M}}$$

$$M = 968,8761 \mu\text{M}$$

#### Concentración de estándares de curva de calibración

$$\text{Fórmula} \rightarrow C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$\text{Ejemplo} \rightarrow \text{Estándar alícuota } 1 \text{ ml} \rightarrow C_2 = \frac{968,88 \mu\text{mol ET} \times 1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 96,89 \mu\text{mol ET}$$

#### Concentración de extractos obtenidos en método ABTS

Ecuación de la curva de calibración  $\rightarrow y = -0,0012x + 0,9785$

$$x = \frac{0,9785 - y}{0,0012}$$

$$\text{Ejemplo} \rightarrow E_{35T1-1} \rightarrow x = \frac{0,9785 - 0,882}{0,0012} = 80,139 \mu\text{mol ET}$$

1) 80,139 → 1000 ml x ← 4,14 ml x = 0,3318 µmol ET	2) 0,3318 → 0,0083 g x ← 0,30864 g x = 12,383 µmol ET	3) 12,383 → 20,5581 g x ← 1 g x = 0,6023 µmol ET/g
--	---	--

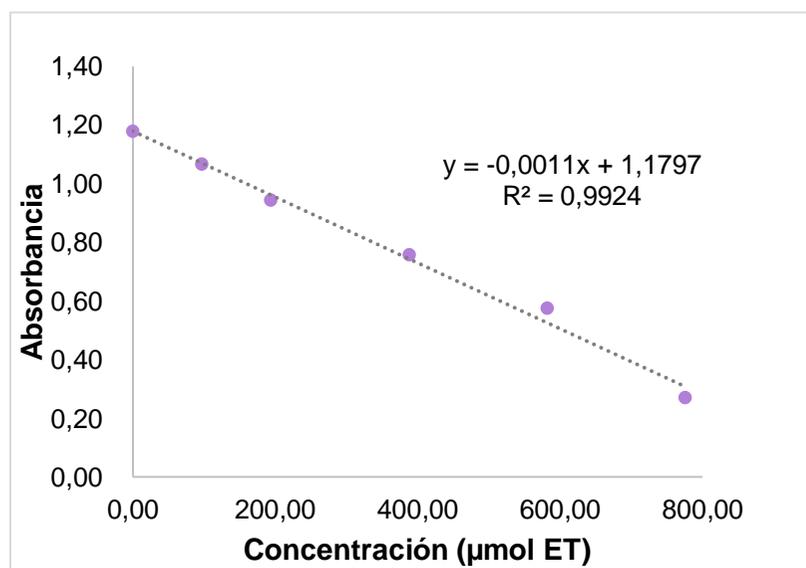
**Tabla 2. 3** Determinación de capacidad antioxidante por método ABTS

Condiciones		Absorbancia				Concentración (µM)	P. de extracto obtenido	V. de MeOH a 2000 ppm (ml)	P. extracto a 2000 ppm (g)	Muestra inicial (g)	Concentración (µmol ET/g)	Media	Desviación	Coef. Variación
T (°C)	P (bar)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio									
35	150	0,881	0,883	0,883	0,882	80,14	0,3086	4,14	0,0083	20,5581	0,60	0,93	0,29	31,41
35	150	0,858	0,861	0,861	0,860	98,75	0,4844	4,18	0,0084	20,6360	1,16			
35	150	0,867	0,868	0,869	0,868	92,08	0,4730	4,085	0,0082	21,0198	1,04			
35	200	0,863	0,862	0,863	0,863	96,53	0,5596	4,08	0,0082	20,6494	1,31	1,48	0,29	19,26
35	200	0,857	0,855	0,855	0,856	102,36	0,7311	4,16	0,0083	20,6567	1,81			
35	200	0,843	0,842	0,846	0,844	112,36	0,4749	4,11	0,0082	20,1113	1,33			
40	150	0,856	0,860	0,858	0,858	100,42	0,9863	4,22	0,0085	20,3307	2,43	1,72	0,66	38,37
40	150	0,882	0,883	0,882	0,882	80,14	0,5706	4,035	0,0081	20,2290	1,13			
40	150	0,825	0,826	0,825	0,825	127,64	0,5080	4,13	0,0083	20,2963	1,60			
40	200	0,856	0,860	0,857	0,858	100,69	0,3482	4,11	0,0082	21,5529	0,81	1,48	0,66	44,40
40	200	0,829	0,831	0,831	0,830	123,47	0,4874	4,08	0,0082	20,0202	1,50			
40	200	0,783	0,785	0,785	0,784	161,81	0,5668	4	0,0080	21,5403	2,13			

## 2.4 Determinación de capacidad antioxidante por método DPPH

### Datos de curva de calibración

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	C. Trolox (μmol ET)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0,00	1,179	1,179	1,176	1,178
1	10	96,89	1,066	1,066	1,067	1,066
2	10	193,78	0,944	0,944	0,946	0,945
4	10	387,55	0,759	0,757	0,757	0,758
6	10	581,33	0,575	0,575	0,576	0,575
8	10	775,10	0,271	0,271	0,272	0,271



### Determinación de concentración de capacidad antioxidante

P. Trolox (g)	P. M (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	C. Solución patrón (μM)
0,0125	250,3	97	50	968,8761

Concentración de solución patrón

$$M = \frac{n}{v} = \frac{m}{PM} \cdot \frac{1}{v} = \frac{0,0125 \text{ g}}{\frac{250 \text{ g}}{\text{mol}}} \cdot \frac{1}{100 \text{ ml}} = 1 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M} \times \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \text{ M}}$$

$$M = 968,8761 \mu\text{M}$$

### Concentración de estándares de curva de calibración

$$\text{Fórmula} \rightarrow C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$\text{Ejemplo} \rightarrow \text{Estándar de alícuota 1 ml} \rightarrow C_2 = \frac{968,88 \mu\text{mol ET} \times 1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} =$$

$$96,89 \mu\text{mol ET}$$

### Concentración de extractos obtenidos en método DPPH

$$\text{Ecuación de curva de calibración} \rightarrow y = -0,0011x + 1,1797$$

$$x = \frac{1,1797 - y}{0,0011}$$

$$\text{Ejemplo} \rightarrow E_{35T1-1} \rightarrow x = \frac{1,1797 - 0,871}{0,0011} = 280,636 \mu\text{mol ET}$$

1) 280,636 → 1000 ml x ← 4,14 ml x = 1,1618 μmol ET	2) 1,1618 → 0,0083 g x ← 0,30864 g x = 43,359 μmol ET	3) 43,359 → 20,5581 g x ← 1 g x = 2,10 μmol ET/g
---	---	--

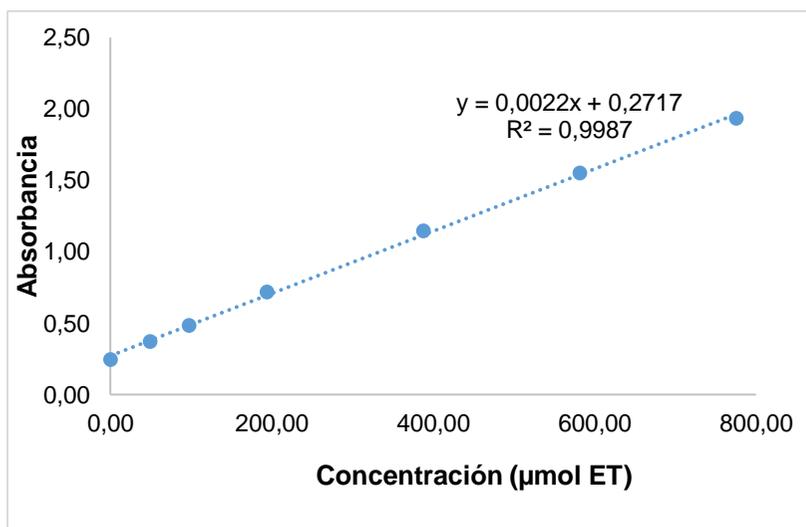
**Tabla 2. 4** Determinación de capacidad antioxidante por método DPPH.

Condiciones		Absorbancia				Concentración (µM)	P. de extracto obtenido (g)	V. de MeOH a 2000 ppm (ml)	P. extracto a 2000 ppm (g)	Muestra (g)	Concentración (µmol ET /g)	Media	Desviación	Coef. Variación
T (°C)	P (bar)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio									
35	150	0,870	0,872	0,872	0,871	280,33	0,3086	4,14	0,0083	20,5581	2,11	2,89	0,69	23,94
35	150	0,860	0,861	0,860	0,860	290,33	0,4844	4,18	0,0084	20,6360	3,41			
35	150	0,871	0,87	0,87	0,870	281,24	0,4730	4,085	0,0082	21,0198	3,16			
35	200	0,874	0,873	0,873	0,873	278,52	0,5596	4,08	0,0082	20,6494	3,77	4,09	0,98	24,04
35	200	0,856	0,858	0,857	0,857	293,36	0,7311	4,16	0,0083	20,6567	5,19			
35	200	0,872	0,872	0,872	0,872	279,73	0,4749	4,11	0,0082	20,1113	3,30			
40	150	0,876	0,876	0,877	0,876	275,79	0,9863	4,22	0,0085	20,3307	6,68	4,44	1,95	43,88
40	150	0,907	0,908	0,906	0,907	247,91	0,5706	4,035	0,0081	20,2290	3,50			
40	150	0,901	0,906	0,903	0,903	251,24	0,5080	4,13	0,0083	20,2963	3,14			
40	200	0,901	0,903	0,903	0,902	252,15	0,3482	4,11	0,0082	21,5529	2,04	3,10	0,96	30,95
40	200	0,874	0,875	0,875	0,875	277,30	0,4874	4,08	0,0082	20,0202	3,38			
40	200	0,854	0,853	0,854	0,854	296,39	0,5668	4	0,0080	21,5403	3,90			

## 2.5 Determinación de capacidad antioxidante por método FRAP

### Datos de curva de calibración

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	C. Trolox (µM)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0,00	0,243	0,243	0,246	0,244
0,5	10	48,44	0,366	0,368	0,370	0,368
1	10	96,89	0,485	0,484	0,484	0,484
2	10	193,78	0,718	0,717	0,717	0,717
4	10	387,55	1,146	1,146	1,145	1,146
6	10	581,33	1,552	1,549	1,549	1,550
8	10	775,10	1,931	1,933	1,933	1,932



### Determinación de concentración de capacidad antioxidante

P. Trolox (g)	P. M (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	C. Solución patrón (µM)
0,0125	250,3	97	50	968,8761

Concentración de solución patrón

$$M = \frac{n}{v} = \frac{m}{PM} \cdot \frac{1}{v} = \frac{0,0125 \text{ g}}{\frac{250 \text{ g}}{\text{mol}}} \cdot \frac{1}{100 \text{ ml}} = 1 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M} \times \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \text{ M}}$$

$$M = 968,8761 \mu\text{M}$$

### Concentración de estándares de curva de calibración

$$\text{Fórmula} \rightarrow C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$\text{Ejemplo} \rightarrow \text{Estándar alícuota 1 ml} \rightarrow C_2 = \frac{968,8761 \mu\text{mol ET} \times 1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} =$$

$$96,89 \mu\text{mol ET}$$

### Concentración de extractos obtenidos en método FRAP

$$\text{Ecuación de curva de calibración} \rightarrow y = -0,0022x + 0,2717$$

$$x = \frac{y - 0,2717}{-0,0022}$$

$$\text{Ejemplo} \rightarrow \text{E35T1-1} \rightarrow x = \frac{0,497 - 0,2717}{-0,0022} = 102,561 \mu\text{mol ET}$$

<b>1)</b> 102,651 → 1000 ml x ← 4,14 ml x = 0,4248 µmol ET	<b>2)</b> 0,4248 → 0,00827 g x ← 0,30864 g x = 15,854 µmol ET	<b>3)</b> 15,854 → 20,558 g x ← 1 g x = 0,77 µmol ET/g
--	---	--

**Tabla 2. 5** Determinación de capacidad antioxidante por método FRAP.

Condiciones		Absorbancia				Concentración (µM ET)	P. extracto obtenido	V. de MeOH a 2000 ppm (ml)	P. extracto a 2000 ppm	Muestra (g)	Concentración (µmol ET/g)	Media	Desviación	Coef. Variación
T (°C)	P (bar)	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio									
35	150	0,497	0,498	0,497	0,497	102,56	0,3086	4,14	0,0083	20,5581	0,77	1,08	0,27	24,96
35	150	0,508	0,507	0,505	0,507	106,80	0,4844	4,18	0,0084	20,6360	1,25			
35	150	0,511	0,51	0,51	0,510	108,47	0,4730	4,085	0,0082	21,0198	1,22			
35	200	0,533	0,532	0,532	0,532	118,47	0,5596	4,08	0,0082	20,6494	1,61	1,48	0,21	14,43
35	200	0,425	0,425	0,425	0,425	69,68	0,7311	4,16	0,0083	20,6567	1,23			
35	200	0,569	0,570	0,571	0,570	135,59	0,4749	4,11	0,0082	20,1113	1,60			
40	150	0,470	0,472	0,473	0,472	90,89	0,9863	4,22	0,0085	20,3307	2,20	1,65	0,48	28,99
40	150	0,480	0,482	0,481	0,481	95,14	0,5706	4,035	0,0081	20,2290	1,34			
40	150	0,520	0,520	0,518	0,519	112,56	0,5080	4,13	0,0083	20,2963	1,41			
40	200	0,442	0,443	0,442	0,442	77,56	0,3482	4,11	0,0082	21,5529	0,63	1,45	0,73	50,28
40	200	0,582	0,582	0,582	0,582	141,05	0,4874	4,08	0,0082	20,0202	1,72			
40	200	0,608	0,608	0,609	0,608	153,02	0,5668	4	0,0080	21,5403	2,01			

### ANEXO 3. Resultados de extracción soxhlet

#### 3.1 Rendimientos de extracción

Tabla 3. 1 Rendimientos de extracción soxhlet

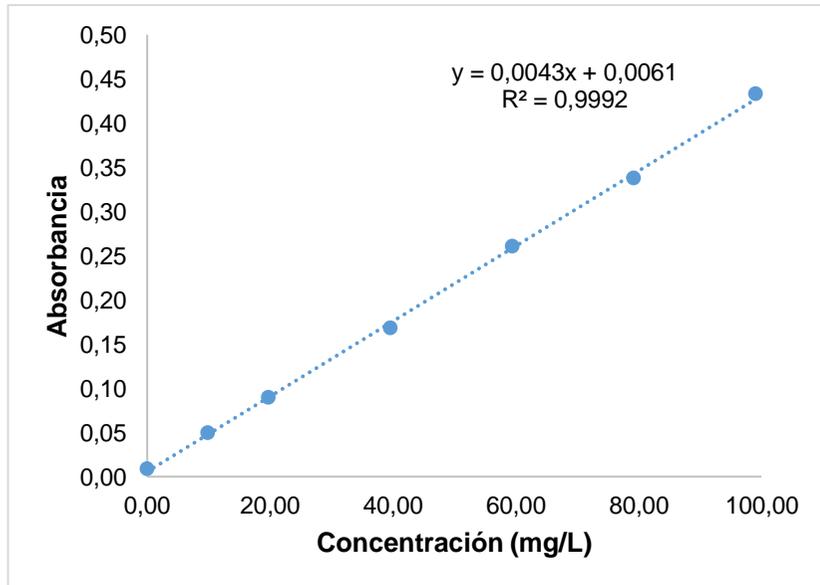
Rendimientos de extracción soxhlet								
Réplica	Tiempo (h)	V. Solvente (ml)	M. inicial (g)	P. extracto (g)	Rendimiento (%)	Media	Desviación	Coef. Variación
ST1	3	250	8,028	0,1348	1,68	1,66	0,05	2,90
ST2	3	250	8,119	0,1378	1,70			
ST3	3	225	8,035	0,1291	1,61			

Cálculo de rendimiento
<p><b>Fórmula</b></p> $R(\%) = \frac{\text{Peso extracto obtenido}}{\text{Peso de muestra inicial alimentada}} \times 100$
<p>Ejemplo: ST1</p> $R(\%) = \frac{0,1348}{8,028} \times 100 = 1,68$

### 3.1 Cuantificación de fenoles totales

#### Datos de curva de calibración

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	AG (mg/L)	Absorbancia			Promedio
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	
0	10	0,00	0,009	0,01	0,009	0,009
0,05	10	9,90	0,050	0,050	0,050	0,050
0,1	10	19,80	0,089	0,090	0,090	0,090
0,2	10	39,60	0,168	0,169	0,167	0,168
0,3	10	59,40	0,260	0,260	0,261	0,260
0,4	10	79,20	0,337	0,339	0,337	0,338
0,5	10	99,00	0,432	0,433	0,433	0,433



#### Determinación de concentración de fenoles totales

P. ácido gálico (g)	PM (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	C. Solución patrón (mg/L)
0,05	170	99	25	1980

Concentración de solución patrón

$$C = \left( \frac{0,05 \text{ g} \times 0,99}{25 \text{ ml}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} \right) \times \left( \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right) = 1980 \text{ mg/L}$$

#### Concentración de estándares de curva de calibración

Fórmula  $\rightarrow C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$

Ejemplo  $\rightarrow$  Estándar con alícuota 0,05 ml

$$C_2 = \frac{1,980 \text{ mg/L} \times 0,05 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 9,9 \text{ mg/L}$$

#### Concentración de fenoles totales en extractos obtenidos

Ecuación de la curva de calibración  $\rightarrow y = 0,0043x + 0,0061$

$$x = \frac{y - 0,0061}{0,0043}$$

Ejemplo  $\rightarrow$  ST1  $\rightarrow x = \frac{0,066 - 0,0061}{0,0043} = 13,853 \text{ mg/L}$

<b>1)</b> 13,853 mg/L $\rightarrow$ 1000 ml x $\leftarrow$ 1 ml x = 0,0139 mg	<b>2)</b> 0,0139 $\rightarrow$ 0,0019 g x $\leftarrow$ 0,1085 g x = 0,7938 mg	<b>3)</b> 0,7938 $\rightarrow$ 8,0275 g x $\leftarrow$ 100 g x = 9,88 mg GAE/100 g
---	---	--

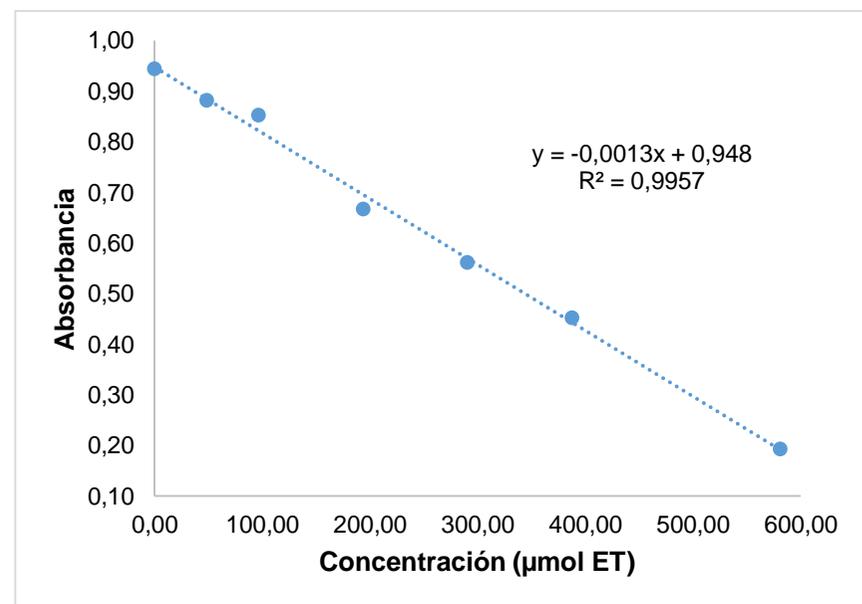
**Tabla 3. 2** Cuantificación de fenoles totales en extractos Soxhlet

Réplica	Aborbancia	Concentración (mg/L)	Extracto obtenido (g)	V. de disolución (ml)	P. extracto (g)	P. muestra inicial (g)	Concentración (mg GAE/100 g)	Media	Desviación	Coef. Variación
ST1	0,066	13,85	0,1085	1	0,0019	8,0275	9,85	10,42	0,63	6,04
ST2	0,062	13,08	0,1378	4,06	0,0081	8,1191	11,10			
ST3	0,061	12,85	0,1291	4,14	0,0083	8,0346	10,32			

### 3.2 Determinación de capacidad antioxidante por método ABTS

#### Datos de curva de calibración

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	C. Trolox (µmol ET)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0,00	0,944	0,945	0,944	0,944
0,5	10	48,44	0,884	0,880	0,882	0,882
1	10	96,89	0,852	0,855	0,851	0,853
2	10	193,78	0,668	0,666	0,669	0,668
3	10	290,66	0,560	0,563	0,562	0,562
4	10	387,55	0,453	0,451	0,453	0,452
6	10	581,33	0,194	0,19	0,195	0,193



**Tabla 3. 3** Determinación de capacidad antioxidante por método ABTS

Réplica	Absorbancia	Concentración (μmol ET)	P. extracto (g)	V. de disolución (ml)	P. extracto a 2000ppm	Muestra (g)	μmol ET/g	Media	Desviación	Coef. Variación
ST1	0,869	60,51	0,1085	1	0,0019	8,0275	0,43	0,47	0,05	9,86
ST2	0,868	61,54	0,1378	4,06	0,00812	8,1191	0,52			
ST3	0,873	57,69	0,1291	4,14	0,0083	8,0346	0,46			

**Determinación de concentración de capacidad antioxidante**

P. Trolox (g)	P. M (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	C. Solución patrón (μM)
0,0125	250,3	97	50	968,8761

**Concentración de solución patrón**

$$M = \frac{n}{v} = \frac{m}{PM} \cdot \frac{1}{v} = \frac{0,0125 \text{ g}}{\frac{250 \text{ g}}{\text{mol}}} \cdot \frac{1}{100 \text{ ml}} = 1 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M} \times \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \text{ M}} = 968,8761 \mu\text{M}$$

**Concentración de estándares de curva de calibración**

Fórmula →  $C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$  → Ejemplo → Estándar con alícuota 1 ml →  $C_2 = \frac{968,8761 \mu\text{mol ET} \times 1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 96,89 \mu\text{mol ET}$

**Concentración de extractos obtenidos en método ABTS**

Ecuación de la curva de calibración →  $y = -0,0013x + 0,948 \rightarrow x = \frac{0,948 - y}{0,0013}$

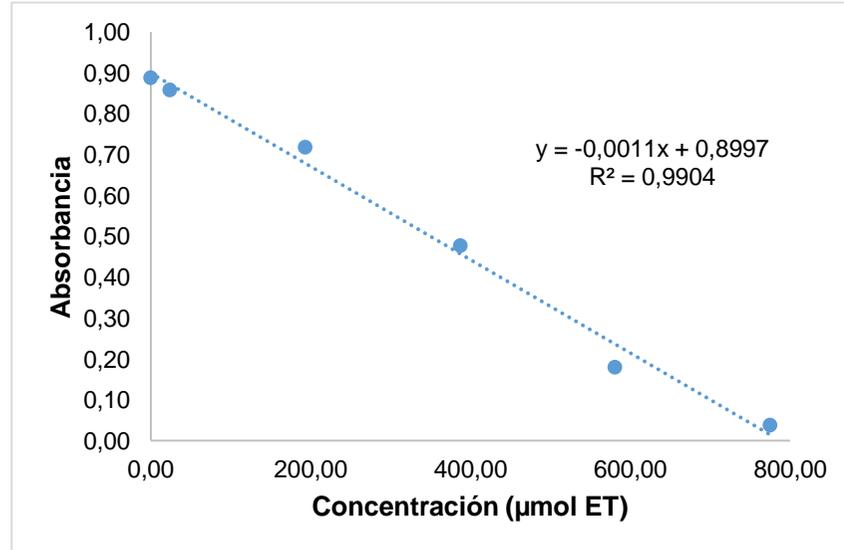
Ejemplo → ST1 →  $x = \frac{0,948 - 0,869}{0,0013} = 60,51 \mu\text{mol ET}$

1) 60,513 → 1000 ml x ← 1 ml x = 0,0605 μmol ET	2) 0,0605 → 0,0019 g x ← 0,1085 g x = 3,4549 μmol ET	3) 3,4549 → 8,0275 g x ← 1 g x = 0,43 μmol ET/g
---	--	---

### 3.3 Determinación de capacidad antioxidante por DPPH

#### Datos de curva de calibración

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	C. Trolox (µM)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0,00	0,888	0,889	0,887	0,888
0,25	10	24,22	0,854	0,864	0,856	0,858
2	10	193,78	0,718	0,719	0,718	0,718
4	10	387,55	0,476	0,477	0,479	0,477
6	10	581,33	0,179	0,181	0,178	0,179
8	10	775,10	0,04	0,037	0,04	0,039



#### Determinación de concentración de capacidad antioxidante

P. Trolox (g)	P. M (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	C. Solución patrón (µM)
0,0125	250,3	97	50	968,8761

Concentración de solución patrón

$$M = \frac{n}{v} = \frac{m}{PM} \cdot \frac{1}{v} = \frac{0,0125 \text{ g}}{\frac{250 \text{ g}}{\text{mol}}} \cdot \frac{1}{100 \text{ ml}} = 1 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M} \times \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \text{ M}}$$

$$M = 968,8761 \mu\text{M}$$

#### Concentración de estándares de curva de calibración

$$\text{Fórmula} \rightarrow C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$$

$$\text{Ejemplo} \rightarrow \text{Estándar de alícuota 2 ml} \rightarrow C_2 = \frac{968,8761 \mu\text{mol ET} \times 2 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} =$$

$$193,78 \mu\text{mol ET}$$

#### Concentración de extractos obtenidos en método DPPH

$$\text{Ecuación de curva de calibración} \rightarrow y = -0,0011x + 0,8997$$

$$x = \frac{0,8997 - y}{0,0011}$$

$$\text{Ejemplo} \rightarrow \text{ST1} \rightarrow x = \frac{0,8997 - 0,883}{0,0011} = 15,485 \mu\text{mol ET}$$

1) 15,485 → 1000 ml x ← 1 ml x = 0,0155 µmol ET	2) 0,0155 → 0,0019 g x ← 0,1085 g x = 0,8851 µmol ET	3) 0,885 → 8,0275 g x ← 1 g x = 0,11 µmol ET/g
---	--	--

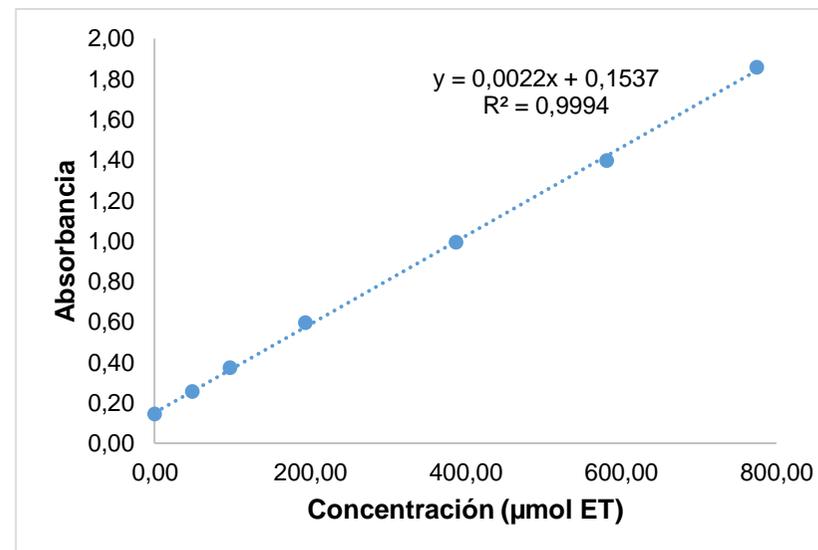
**Tabla 3. 4** Determinación de capacidad antioxidante por método DPPH

Réplica	Aborbancia	Concentración (μmol ET)	P. extracto (g)	V. de disolución (ml)	P. extracto a 2000 ppm (g)	Muestra (g)	μmol ET/g	Media	Desviación	Coef. Variación
ST1	0,883	15,49	0,1085	1	0,0019	8,0275	0,11	0,12	0,02	18,71
ST2	0,881	17,00	0,1378	4,06	0,0081	8,1191	0,14			
ST3	0,886	12,76	0,1291	4,14	0,0083	8,0346	0,10			

### 3.4 Determinación de capacidad antioxidante por método FRAP

#### Datos de curva de calibración

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	C. Trolox (μmol ET)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0,00	0,143	0,143	0,143	0,143
0,5	10	48,44	0,255	0,256	0,256	0,256
1	10	96,89	0,373	0,376	0,371	0,373
2	10	193,78	0,595	0,595	0,596	0,595
4	10	387,55	0,995	0,994	0,99	0,993
6	10	581,33	1,395	1,396	1,397	1,396
8	10	775,10	1,859	1,853	1,857	1,856



**Tabla 3. 5** Determinación de capacidad antioxidante por método FRAP

Réplica	Absorbancia	Concentración (μmol ET)	P. extracto (g)	V. de disolución (ml)	P. extracto a 2000 ppm (g)	Muestra (g)	μmol ET/g	Media	Desviación	Coef. Variación
ST1	0,414	118,32	0,1085	1	0,0019	8,0275	0,84	0,83	0,10	11,44
ST2	0,344	86,65	0,1378	4,06	0,0081	8,1191	0,74			
ST3	0,407	115,29	0,1291	4,14	0,0083	8,0346	0,93			

**Determinación de concentración de capacidad antioxidante**

P. Trolox (g)	P. M (g/mol)	Riqueza (%)	Aforo (ml)	C. Solución patrón (μM)
0,0125	250,3	97	50	968,8761

**Concentración de solución patrón**

$$M = \frac{n}{v} = \frac{m}{PM} \cdot \frac{1}{v} = \frac{0,0125 \text{ g}}{250 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \cdot \frac{1}{100 \text{ ml}} = 1 \times 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 1 \times 10^{-3} \text{ M} \times \frac{10^6 \mu\text{M}}{1 \text{ M}} = 968,8761 \mu\text{M}$$

**Concentración de estándares de curva de calibración**

Fórmula  $\rightarrow C_1V_1 = C_2V_2 \rightarrow C_2 = \frac{C_1V_1}{V_2}$   $\rightarrow$  Ejemplo  $\rightarrow$  Estándar con alícuota 1 ml  $\rightarrow C_2 = \frac{968,8761 \mu\text{mol ET} \times 1 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} = 96,89 \mu\text{mol ET}$

**Concentración de extractos obtenidos en método FRAP**

Ecuación de la curva de calibración  $\rightarrow y = -0,0022x + 0,1537 \rightarrow x = \frac{0,1537 - y}{0,0022}$

Ejemplo  $\rightarrow$  ST1  $\rightarrow x = \frac{0,1537 - 0,414}{0,0022} = 118,32 \mu\text{mol ET}$

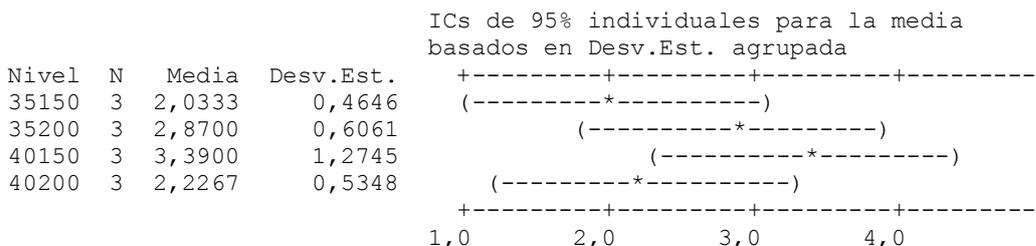
1) 118,32 μmol ET $\rightarrow$ 1000 ml x $\leftarrow$ 1 ml x = 0,11832 μmol ET	2) 0,11832 $\rightarrow$ 0,0019 g x $\leftarrow$ 0,1085 g x = 6,757 μmol ET	3) 6,757T $\rightarrow$ 8,0275 g x $\leftarrow$ 1 g x = 0,84 μmol ET/g
---	---	--

## ANEXO 4. Análisis estadístico

### ANOVA unidireccional: Rendimientos vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variables	3	3,462	1,154	1,85	0,216
Error	8	4,987	0,623		
Total	11	8,449			

S = 0,7895    R-cuad. = 40,97%    R-cuad. (ajustado) = 18,84%

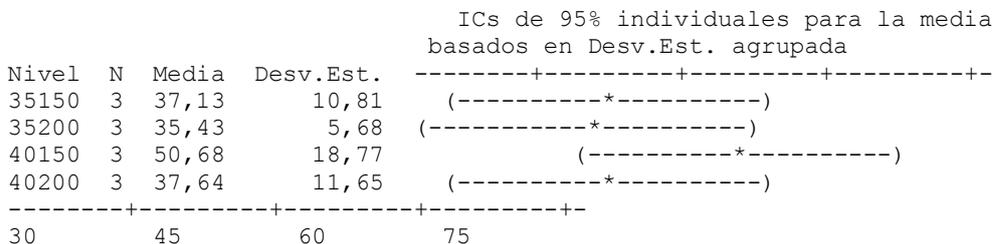


Desv.Est. agrupada = 0,7895

### ANOVA unidireccional: Fenoles vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variables	3	446	149	0,93	0,469
Error	8	1275	159		
Total	11	1720			

S = 12,62    R-cuad. = 25,90%    R-cuad. (ajustado) = 0,00%

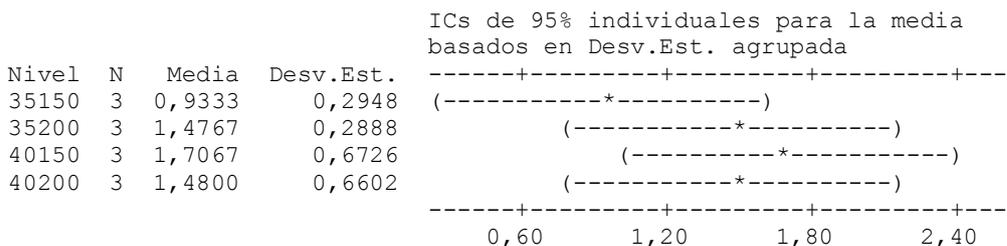


Desv.Est. agrupada = 12,62

### ANOVA unidireccional: ABTS vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variables	3	0,972	0,324	1,22	0,362
Error	8	2,117	0,265		
Total	11	3,090			

S = 0,5145    R-cuad. = 31,47%    R-cuad. (ajustado) = 5,77%

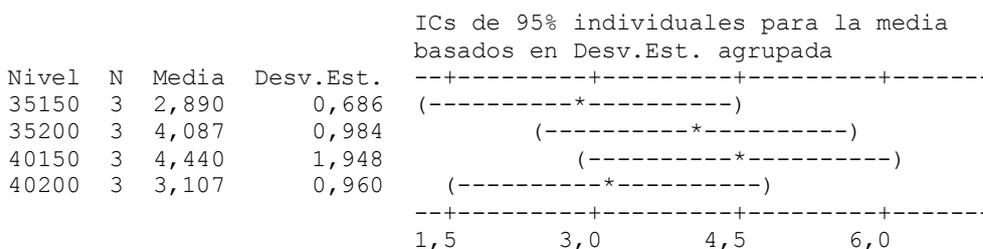


Desv.Est. agrupada = 0,5145

### ANOVA unidireccional: DPPH vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variables	3	5,06	1,69	1,10	0,405
Error	8	12,31	1,54		
Total	11	17,37			

S = 1,241 R-cuad. = 29,12% R-cuad. (ajustado) = 2,54%

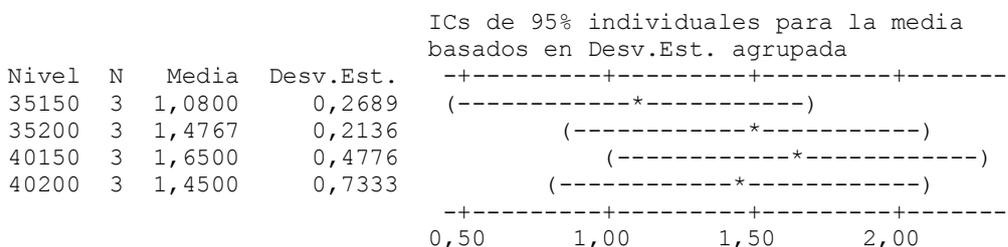


Desv.Est. agrupada = 1,241

### ANOVA unidireccional: FRAP vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variables	3	0,517	0,172	0,78	0,537
Error	8	1,767	0,221		
Total	11	2,285			

S = 0,4700 R-cuad. = 22,65% R-cuad. (ajustado) = 0,00%

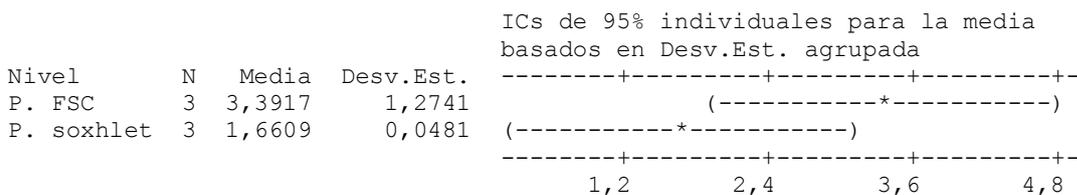


Desv.Est. agrupada = 0,4700

### ANOVA unidireccional: Rendimientos vs. Proceso de extracción

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	4,493	4,493	5,53	0,078
Error	4	3,251	0,813		
Total	5	7,745			

S = 0,9016 R-cuad. = 58,02% R-cuad. (ajustado) = 47,52%

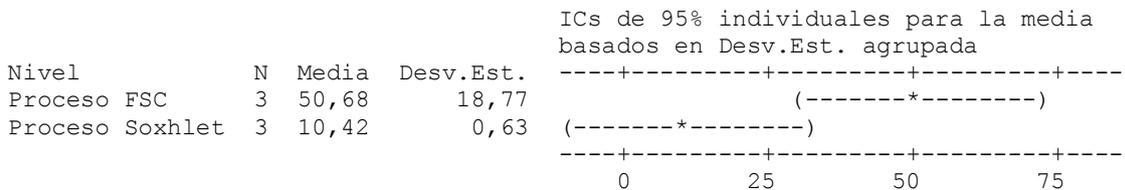


Desv.Est. agrupada = 0,9016

**ANOVA unidireccional: Fenoles vs. Proceso de extracción**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	2431	2431	13,79	0,021
Error	4	705	176		
Total	5	3136			

S = 13,28 R-cuad. = 77,51% R-cuad. (ajustado) = 71,89%

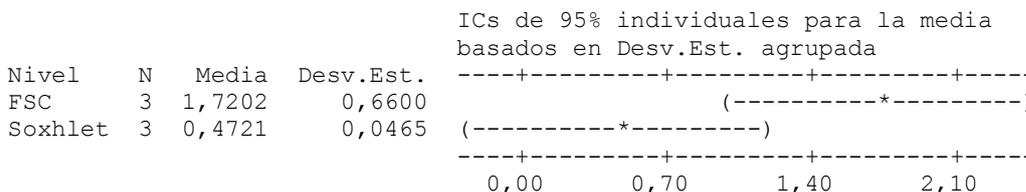


Desv.Est. agrupada = 13,28

**ANOVA unidireccional: ABTS vs. Proceso de extracción**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	2,337	2,337	10,68	0,031
Error	4	0,875	0,219		
Total	5	3,212			

S = 0,4678 R-cuad. = 72,75% R-cuad. (ajustado) = 65,93%

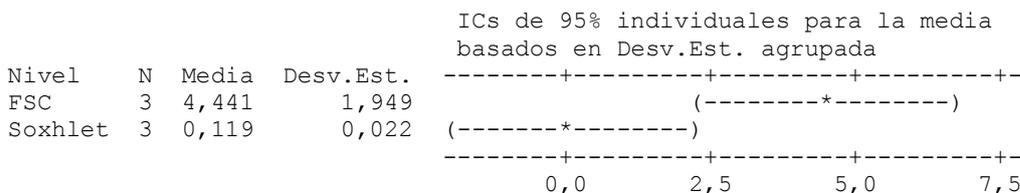


Desv.Est. agrupada = 0,4678

**ANOVA unidireccional: DPPH vs. Proceso de extracción**

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	28,02	28,02	14,75	0,018
Error	4	7,60	1,90		
Total	5	35,61			

S = 1,378 R-cuad. = 78,67% R-cuad. (ajustado) = 73,34%



Desv.Est. agrupada = 1,378

### ANOVA unidireccional: FRAP vs. Proceso de extracción

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	1,000	1,000	8,40	0,044
Error	4	0,476	0,119		
Total	5	1,476			

S = 0,3451    R-cuad. = 67,73%    R-cuad.(ajustado) = 59,67%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.
FSC	3	1,6509	0,4786
Soxhlet	3	0,8344	0,0955

-----+-----+-----+-----+-----  
 (-----\*-----)  
 (-----\*-----)  
 -----+-----+-----+-----+-----  
 0,50      1,00      1,50      2,00

Desv.Est. agrupada = 0,3451