



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA**

TITULACIÓN DE INGENIERO QUÍMICO

**Subproductos de cacao como fuente de compuestos antioxidantes**

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

**AUTOR:** Carpio Jiménez, Johana Mariuxi.

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

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: **Subproductos de cacao como fuente de compuestos antioxidantes** realizado por **Carpio Jiménez Johana Mariuxi**, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre del 2014.

f) Ing. Guamán Balcázar, María del Cisne.

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Johana Mariuxi Carpio Jiménez** declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **Subproductos de cacao como fuente de compuestos antioxidantes**, de la Titulación de Ingeniero Químico, 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”

Autora: Carpio Jiménez Johana Mariuxi.

C.I: 1104627110

## DEDICATORIA

A Dios por la fuerza y protección que me da cada día de mi vida.

*A mis padres con mucho cariño, José y Macrina por su apoyo incondicional, mi ejemplo a seguir, por impulsarme cada día, darme su amor y las herramientas para cumplir con esta meta.*

*A mis hermanos Katy, Lilia, Junior y Byron por su apoyo incondicional en todas etapas de mi vida y mi ejemplo a seguir, a Franklin quien me ha apoyado y se ha convertido en un hermano más.*

*A mis sobrinos hermosos que los amo con mi vida Andres, Elías y Maite, pequeños angelitos que alegran mis días con sus pequeñas travesuras.*

*A mis abuelitos, tíos y primos por su apoyo incondicional, especialmente a mi tía Hilda.*

*Johana Carpio*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por permitir mi superación cada día.

A mis padres José y Macrina por su apoyo incondicional durante toda mi vida, que sin ellos esto no fuera posible y a mis hermanos Katy, Lilia, Junior y Byron que en momentos difíciles siempre han estado conmigo.

De manera especial a la Ing. María del Cisne Guamán, por la confianza, apoyo y tiempo para desarrollar de este proyecto.

Al Ing. Geovanny Figueroa quien en los últimos seis meses, dedico su tiempo para guiarme en esta etapa.

Al Ing. Miguel Meneses por su tiempo, dedicación y apoyo incondicional durante el desarrollo del proyecto.

A la Ing. Diana Guaya por su tiempo, dedicación y consejos que me han permitido mejorar en este proyecto.

Al Departamento de Ciencias de los Alimentos y Agropecuarias por permitir el desarrollo del presente proyecto; a todos los que trabajan en el mismo especialmente al Ing. Olger por su apoyo cada día.

A mis amigas Malú, Denisse, Ale, Kary C, Kary V, Daya, Gaby, quienes hemos compartido momentos inolvidables durante estos cinco años, gracias por su apoyo incondicional en momentos difíciles y por cada locura vivida las voy a extrañar.

A Karla que en este ultimo año más que una compañera se ha convertido en una gran amiga con quien hemos superado cada obstáculo presente en este proyecto.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	i
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN .....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE TABLAS .....	10
NOMENCLATURA.....	11
RESUMEN.....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVO.....	16
PROPÓSITO U OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO. ....	16
COMPONENTE U OBJETIVOS ESPECÍFICO DEL PROYECTO. ....	16
1. MARCO TEÓRICO .....	17
1.1. Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> L.).....	18
1.2. Producción de cacao .....	18
1.3. Residuos de cacao.....	19
1.4. Extracción de compuestos antioxidantes.....	20
1.4.1. Extracción líquido-líquido .....	21
1.4.2. Extracción sólido-líquido .....	21
1.4.2.1. Extracción con fluidos supercríticos.....	21
1.4.2.2. El Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) como fluido supercrítico. ....	23
1.4.2.2.1. Descripción del equipo de extracción con FSC.....	23

1.5. Compuestos fenólicos.....	24
1.5.1. Compuestos fenólicos del cacao .....	25
1.6. Antioxidantes.....	26
1.6.1. Determinación de actividad antioxidante .....	26
1.7. Determinación de fenoles totales .....	27
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
2.1. Materiales .....	29
2.1.1. Reactivos.....	29
2.1.2. Muestra .....	29
2.2. Métodos.....	30
2.2.1. Preparación de la materia prima.....	30
2.2.2. Obtención de extractos lipofílicos. ....	30
2.2.2.1. <i>Extracción con fluidos supercríticos</i> .....	30
2.2.2.2. <i>Extracción por el método Soxhlet</i> .....	34
2.3. Determinación de fenoles totales .....	34
2.4. Determinación de actividad antioxidante.....	34
2.4.1. Método ABTS .....	34
2.4.2. Método DPPH.....	35
2.4.3. Método FRAP .....	35
2.5. Análisis Estadístico .....	35
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
3.1. Rendimientos de extracción.....	37
3.2. Fenoles totales .....	40
3.3. Actividad Antioxidante .....	41
3.3.1. ABTS .....	41
3.3.2. FRAP .....	42

<b>3.3.3. DPPH .....</b>	<b>44</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo A: Diagramas de metodología. ....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO B: Curvas de calibración. ....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO C: Resultados .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO D: Resultados de análisis estadístico ANOVA .....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.1.</b> Planta de cacao.	18
<b>Figura 1.2.</b> Diagrama de fases del CO <sub>2</sub> .	22
<b>Figura 1.3.</b> Diagrama del equipo de FSC.	24
<b>Figura 1.4.</b> Estructuras de compuestos fenólicos más conocidas.	25

### CAPÍTULO II

<b>Figura 2.1.</b> Ubicación de la Asociación Kallari en el mapa del Ecuador.	30
<b>Figura 2.2.</b> Equipo de FSC de la UTPL.	31
<b>Figura 2.3.</b> Muestra de cáscara de cacao y extractor de 100 ml de capacidad del equipo de FSC.	32
<b>Figura 2.4.</b> Extracto obtenido utilizando CO <sub>2</sub> -SC a partir de cáscara de cacao.	33

### CAPÍTULO III

<b>Figura 3.1.</b> Resultados de rendimientos de extracción a diferentes condiciones utilizando FSC y soxhlet.	37
<b>Figura 3.2.</b> Gráfica de efectos principales de las condiciones de P y T sobre el rendimiento en FSC y soxhlet.	38
<b>Figura 3.3.</b> Gráfica de interacción de las condiciones de P y T sobre el rendimiento en FSC y soxhlet	39
<b>Figura 3.4.</b> Resultados del contenido de fenoles totales a diferentes condiciones	40
<b>Figura 3.5.</b> Resultados de capacidad antioxidante por el método ABTS en $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS de cada condición utilizada en FSC y soxhlet.	41
<b>Figura 3.6.</b> Resultados del método FRAP en $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS de cada condición utilizada en FSC y soxhlet.	43
<b>Figura 3.7.</b> Resultados de capacidad antioxidantes por el método DPPHen $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS de cada condición utilizada en FSC y soxhlet.	44

## ÍNDICE DE TABLAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabla 1.1.</b> Clasificación botánica de la planta de cacao.	18
<b>Tabla 1.2.</b> Producción de cacao a nivel mundial.	19
<b>Tabla 1.3.</b> Composición de la cáscara de cacao por cada 100 gr.	20
<b>Tabla 1.4.</b> Extracción de compuestos bioactivos con fluidos supercríticos.	23

## NOMENCLATURA

<b>CO<sub>2</sub>:</b>	Dióxido de carbono
<b>ABTS:</b>	Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico.
<b>DPPH:</b>	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.
<b>FRAP:</b>	Poder antioxidante de reducción férrica.
<b>SFE:</b>	Extracción con fluidos supercríticos.
<b>CO<sub>2</sub>-SC:</b>	Dióxido de carbono supercrítico.
<b>Pc:</b>	Presión crítica.
<b>Tc:</b>	Temperatura crítica.
<b>P:</b>	Presión.
<b>T:</b>	Temperatura.
<b>AA:</b>	Actividad Antioxidante.
<b>TPTZ:</b>	Complejo férrico-2, 4,6-tripiridil-s-triazina.
<b>INEN:</b>	Instituto Nacional Ecuatoriano de Normalización.
<b>mg:</b>	Miligramos.
<b>µL:</b>	Microlitros.
<b>GAE:</b>	Equivalentes de ácido gálico.
<b>MS:</b>	Muestra seca.
<b>SP:</b>	Solución patrón.
<b>ST:</b>	Solución de trabajo.
<b>µmol:</b>	Micromoles.
<b>mM:</b>	Milimolar.
<b>H<sub>2</sub>O:</b>	Agua.
<b>MeOH:</b>	Metanol.
<b>ρ:</b>	Densidad en Kg/m <sup>3</sup>
<b>E35C-1:</b>	Extracto de cáscara de cacao en condiciones de 35 °C - 150 bar.
<b>E35C-2:</b>	Extracto de cáscara de cacao en condiciones de 35 °C - 200 bar.
<b>E40C-1:</b>	Extracto de cáscara de cacao en condiciones de 40 °C - 150 bar.
<b>E40C-2:</b>	Extracto de cáscara de cacao en condiciones de 40 °C - 200 bar.

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la disponibilidad de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) como fuente de antioxidantes. Las muestras utilizadas fueron proporcionadas por la empresa Kallari, ubicada en Tena-Ecuador. La extracción se realizó empleando CO<sub>2</sub> en condiciones supercríticas con un flujo continuo de 10000 ml/min por 3 horas; se evaluó el efecto de presión (150 y 200 bares) y temperatura (35 y 40 °C) sobre el rendimiento de extracción, concentración de fenoles totales y actividad antioxidante. Se empleó el método soxhlet como patrón de comparación utilizando hexano como solvente. El potencial antioxidante fue evaluado mediante los métodos ABTS, FRAP y DPPH; y el contenido de fenoles totales empleando el método Folin-Ciocalteu. Los resultados mostraron que las mejores condiciones de extracción fueron 150 bar y 35 °C. Se encontró un rendimiento del 0.46% w/w. El contenido de fenoles totales fue 59.06% mayor al encontrado por el método soxhlet. Los resultados de actividad antioxidante con los métodos ABTS, FRAP y DPPH fueron mayores en comparación con el método soxhlet en 115.51%, 11.88% y 126.46% respectivamente.

**Palabras clave:** Cáscara de cacao, CO<sub>2</sub>-SC, presión, temperatura, rendimiento, fenoles totales, capacidad antioxidante.

## ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the availability of cocoa shell (*Theobroma cacao* L.) as source of natural antioxidants. The samples used were provided by Kallari company located in Tena, Ecuador. The extraction was performed using CO<sub>2</sub> at supercritical conditions with a continuous flow of 10000 ml / min, 3 hours. The effect of pressure (150 to 200 bars) and temperature (35 and 40 °C) was evaluated on the extraction yield, total phenolic content and the antioxidant activity of the extract. The soxhlet method was used as standard for comparing using hexane as solvent. The antioxidant capacity was evaluated by ABTS, FRAP and DPPH assay; and total phenolic content using the Folin-Ciocalteu method. The best conditions for extraction were 150 bar and 35 °C, at this conditions the yield was 0.46% w/w. The total phenolic content was 59.06% higher than the one found by the soxhlet method. The results of antioxidant activity with ABTS, DPPH and FRAP methods were higher compared to the soxhlet method 115.51%, 11.88% and 126.46% respectively.

**Keywords:** Cocoa shell, SC-CO<sub>2</sub>, pressure, temperature, yield, total phenolics, antioxidant capacity.

## INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país con una gran producción de cacao, tiene el 70% de la producción de cacao fino y de aroma a nivel global; ocupando así el séptimo lugar como productor mundial.<sup>1</sup>

En la explotación del cacao solo se aprovecha económicamente la semilla, que representa un 10% del peso del fruto fresco; resultando como residuos del proceso de beneficio del cacao cáscara y testa. La testa representa alrededor del 12,5% del peso del grano seco obtenido luego de la fermentación<sup>2</sup>, mientras que la cáscara constituye el 80% del fruto fresco, el cual es desechado por los agricultores.<sup>3</sup>

En el proceso de beneficio de cacao, no se contempla la disposición de los residuos que se generan en el mismo; los altos volúmenes, especialmente de cáscara que se desechan anualmente; se consideran un foco para la propagación de plaga *Phytophthora spp*; que provoca pérdidas económicas en la actividad cacaotera.<sup>4</sup>

En el Ecuador los subproductos de cacao son desaprovechados y considerados como desechos. Estudios realizados por Hii et al.<sup>5</sup> y Martínez et al.<sup>6</sup> afirman, que en subproductos como cáscara y testa se encuentra gran cantidad de compuestos polifenólicos y presentan una importante actividad antioxidante. Los grupos de polifenoles más abundantes en cacao son flavonoides, entre las que se destacan catequinas, antocianinas y proantocianidinas.<sup>7</sup>

Estos compuestos tienen como función biológica acciones antibacteriales, antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antitrombóticas, antivirales, anticarcinogénicas y vasodilatadoras, también intervienen en la prevención de enfermedades coronarias y desórdenes neurodegenerativos; estas funciones biológicas se deben a su capacidad antioxidante y a la estabilización de radicales libres.<sup>8</sup>

La extracción con fluidos supercríticos (EFS), es un método más selectivo en comparación con una extracción convencional; por esta razón es óptima para ser utilizada en la industria alimenticia y con fines farmacéuticos.<sup>9</sup> El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es el disolvente más adecuado para EFS de compuestos termolábiles; debido a su carácter no tóxico, no inflamable, alta disponibilidad, bajo costo y alta pureza, lo que permite una reproducción óptima físico-química, biológica y terapéutica de las propiedades de los compuestos. Los extractos con CO<sub>2</sub> supercrítico (CO<sub>2</sub>-SC) son considerados como "naturales", están libres de microorganismos patógenos y de deterioro, esporas, y enzimas; la ausencia de la luz y el oxígeno evita oxidaciones.<sup>10</sup>

Debido a la alta producción de cacao en nuestro país y generación de subproductos del mismo; el Departamento de Ciencias Agropecuarias y de Alimentos de la Universidad Técnica Particular de Loja, pretende realizar un estudio aprovechando la riqueza de la cáscara de cacao; aplicando el método de extracción con fluidos supercríticos, debido a las ventajas ya mencionadas; favoreciendo al desarrollo de una las regiones orientales del país específicamente a la provincia de Napo; ya que es una de las provincias con gran producción de cacao en nuestro país.

## **OBJETIVO.**

### **PROPÓSITO U OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO.**

Evaluar la riqueza de la cáscara de cacao como fuente de antioxidantes contribuyendo al aprovechamiento industrial de los subproductos de cacao.

### **COMPONENTE U OBJETIVOS ESPECÍFICO DEL PROYECTO.**

- Cuantificar el rendimiento de extracción de las fracciones lipofílicas.
- Determinar el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de las fracciones lipofílicas.

## **1. MARCO TEÓRICO**

### 1.1. Cacao (*Theobroma cacao* L.).

El cultivo del cacao tuvo su origen en América del Sur<sup>11</sup>, pero no se puede indicar con precisión el lugar específico ni su distribución; aún sigue siendo tema de discusión<sup>12</sup>; en la Tabla 1.1. se muestra la clasificación botánica de la planta de cacao.

**Tabla 1.1** Clasificación botánica de la planta de cacao

	<b>División</b>	Espermatofita
	<b>Clase</b>	Angiosperma
	<b>Orden</b>	<i>Malvales</i>
	<b>Familia</b>	<i>Theobroma</i>
	<b>Género</b>	<i>Esterculiáceas</i>
	<b>Especie</b>	<i>Cacao</i>
	<b>Figura 1.1.</b> Planta de cacao. <b>Fuente:</b> EruditosisWiki. <sup>13</sup>	

**Fuente:** Batista.<sup>14</sup>

El cacao se clasifica en tres variedades: el Criollo, el Forastero y el Trinitario.<sup>15</sup> El primero es conocido como cacao fino; produce un fruto aromático, afrutado y dulce; el forastero produce granos con un aroma agridulce y se lo reconoce como uno de los cacaos más finos del mundo. Por último, el trinitario es una variedad obtenida por el cruce entre criollo y forastero, tiene un sabor condimentado (especias) y un aroma floral.<sup>16</sup>

En Ecuador se produce dos tipos de cacao: el forastero o cacao fino y el nacional conocido también como la “pepa de oro”; con aroma, sabor y alta calidad única que distinguen al cacao ecuatoriano.<sup>17</sup>

### 1.2. Producción de cacao

El cacao se cultiva principalmente en la región oeste del continente Africano, Centro y Sudamérica y Asia. Los principales países productores son Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Brasil, Camerún, Ecuador y Malasia.<sup>18</sup>

Tradicionalmente, los países productores cubren la mayor parte de las exportaciones mundiales. No obstante, Brasil y Malasia que son importantes productores, no necesariamente se identifican como exportadores debido al tamaño de la industria local, que absorbe la mayor parte de la producción del grano.<sup>19</sup>

En la Tabla 1.2. se muestra la producción de cacao en grano a nivel mundial de cada continente, en Miles de toneladas por año; donde se puede destacar que en el continente americano mantiene su producción en el transcurso de los años.

**Tabla 1.2.** Producción de cacao a nivel de mundial.

<b>Producción de cacao en grano por continentes 2005/2010 (Miles Toneladas)</b>					
<b>CONTINENTE</b>	<b>2005/06</b>	<b>2006/07</b>	<b>2007/08</b>	<b>2008/00</b>	<b>2009/10</b>
<b>África</b>	2.655,30	2.366,40	2.692,70	2.520,20	2.469
<b>América</b>	461,2	422,6	488,7	482,9	498,3
<b>Asia y Oceanía</b>	694,2	650,3	590,8	589,60	629
<b>Total Mundial</b>	3.810,70	3.439,30	3.732,20	3.592,60	3.596,30

Fuente: FEDECACAO.<sup>20</sup>

### **1.3. Residuos de cacao**

Expertos en la fabricación de productos a base de cacao, determinan que un rendimiento de 100 Kg de semillas de cacao representa alrededor del 85%; el valor restante es considerado como residuos (cáscara y testa) resultantes del proceso de beneficio del cacao; sólo la cáscara de cacao corresponde el 12%.<sup>3</sup>

La cáscara de cacao posee un pigmento que es un poliflavonoglucósido. Este pigmento es muy requerido por ser resistente al calor y a la luz, muy estable a pH de 3 a 11 y muy usado como colorante de alimentos.<sup>21</sup>

Las cáscaras de cacao se han propuesto como fuente de pectinas a nivel comercial, por su relativo bajo costo.<sup>4</sup>

En la tabla 1.3. se detalla la composición por cada 100 g de cáscara <sup>22</sup>

**Tabla 1.3.** Composición de la cáscara de cacao por cada 100 gr.

Componente	Contenido
<b>Humedad</b>	4,60%
<b>Fibra dietética total</b>	43,50%
<b>Proteína bruta</b>	14,90%,
<b>Lípidos</b>	2,20%
<b>Sales minerales</b>	13,50%
<b>Azúcares reductores</b>	0,80%
<b>Almidón</b>	1,10%
<b>Lignina Klason</b>	13,70%
<b>Compuestos polifenólicos</b>	0,70%
<b>Taninos</b>	0,17%
<b>Teobromina</b>	1,10%
<b>Cafeína</b>	0,11%
<b>Ácido fítico</b>	1%

Fuente: Rius.<sup>22</sup>

#### **1.4. Extracción de compuestos antioxidantes**

Se consideran dos tecnologías diferentes para la extracción con disolventes de compuestos antioxidantes a partir de residuos de actividades industriales: extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido.<sup>23</sup>

### **1.4.1. Extracción líquido-líquido**

Se basa en la distribución de los solutos entre dos fases inmiscibles en las cuales el compuesto y la matriz tienen solubilidades diferentes.<sup>23</sup>

### **1.4.2. Extracción sólido-líquido**

Consiste en la separación de compuestos antioxidantes a partir de residuos sólidos, los cuales requieren ser extraídos con disolventes convencionales y posteriormente eliminar el disolvente para obtener un extracto concentrado.<sup>23</sup> La extracción soxhlet es una de las técnicas convencionales más utilizadas.<sup>24</sup>

Hoy en día existen nuevos métodos de extracción reduciendo tiempos, menor uso de disolventes orgánicos y reducción en la contaminación del medio ambiente empleando: extracción asistida por ultrasonidos, extracción con pulsos eléctricos, extracción asistida por microondas, extracción acelerada con disolventes y extracción con fluidos supercríticos.<sup>23</sup>

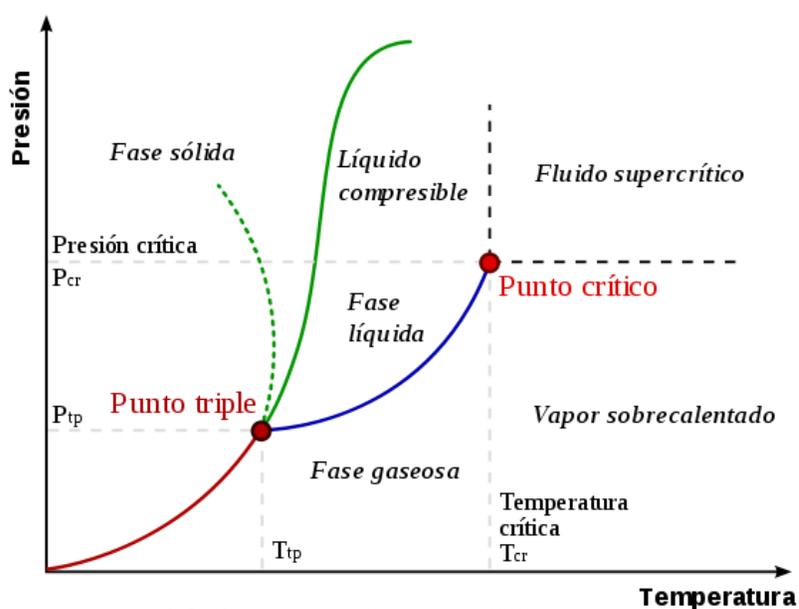
#### **1.4.2.1. Extracción con fluidos supercríticos**

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico.<sup>25</sup> Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción.<sup>10</sup>

En la Figura. 1.2. se observa los tres estados de agregación la materia del CO<sub>2</sub>, estos están separados por líneas que representan los equilibrios sólido-líquido o de fusión, sólido-gas o de sublimación y líquido-gas o de vaporización; el punto triple, es donde coexisten los tres estados.<sup>26</sup>

También se puede ver que no existe línea que delimite la zona del estado supercrítico; al calentar una mezcla líquido- vapor a volumen constante; la densidad del líquido disminuye y la del gas aumenta, hasta que en el punto crítico estas se vuelven iguales y la interfase que las

separa desaparece. Cuando la mezcla se aproxima al punto crítico comienzan a producirse fluctuaciones en la densidad de ambas fases, en regiones de dimensiones microscópicas dando lugar a un fenómeno de dispersión lumínica típico conocido como “opalescencia crítica”. El punto crítico es la presión y la temperatura a las cuales el gas y el líquido son indistinguibles, por encima de éste los fluidos presentan características de ambas fases, propiedades similares a las de los gases como su gran difusividad (capacidad de difundir a través de un medio), y otras que los asemejan más a los líquidos como su alta densidad.<sup>27</sup>



**Figura 1.2.** Diagrama de fases del CO<sub>2</sub>.

**Fuente:** Domínguez y Parzanese.<sup>27</sup>

La extracción supercrítica es una operación unitaria de transferencia de masa que se efectúa por encima del punto supercrítico del solvente, similar a la extracción clásica con la particularidad de utilizar como agente extractor un FSC en lugar de un líquido.<sup>28</sup>

Este proceso consiste en la presurización del gas a utilizar como solvente; elevando la presión por encima de su presión crítica  $P_c$ ; esta operación se realiza por medio de una bomba. El ajuste de temperatura se lo efectúa adicionando energía térmica; mediante un intercambiador de calor (resistencias eléctricas), para llevar el solvente comprimido a la temperatura de extracción requerida; estado que está por encima de su  $T_c$ . El FSC es conducido al extractor

donde se encuentra la muestra o materia prima que contiene los compuestos de interés a extraer; estos son llevados al separador donde el gas se descomprime a una presión inferior a la presión crítica, liberando el soluto en el separador.<sup>26</sup>

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

El CO<sub>2</sub> es el fluido supercrítico más utilizado debido a que no es tóxico, no es inflamable, no es corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente, no deja residuos; sus condiciones de presión (73.86 bares) y temperatura (31 °C); son relativamente fáciles de alcanzar, se puede trabajar a baja temperatura y por tanto, separar compuestos termolábiles.<sup>10</sup> En la Tabla 1.4 se muestra algunos compuestos extraídos con CO<sub>2</sub> - SC.

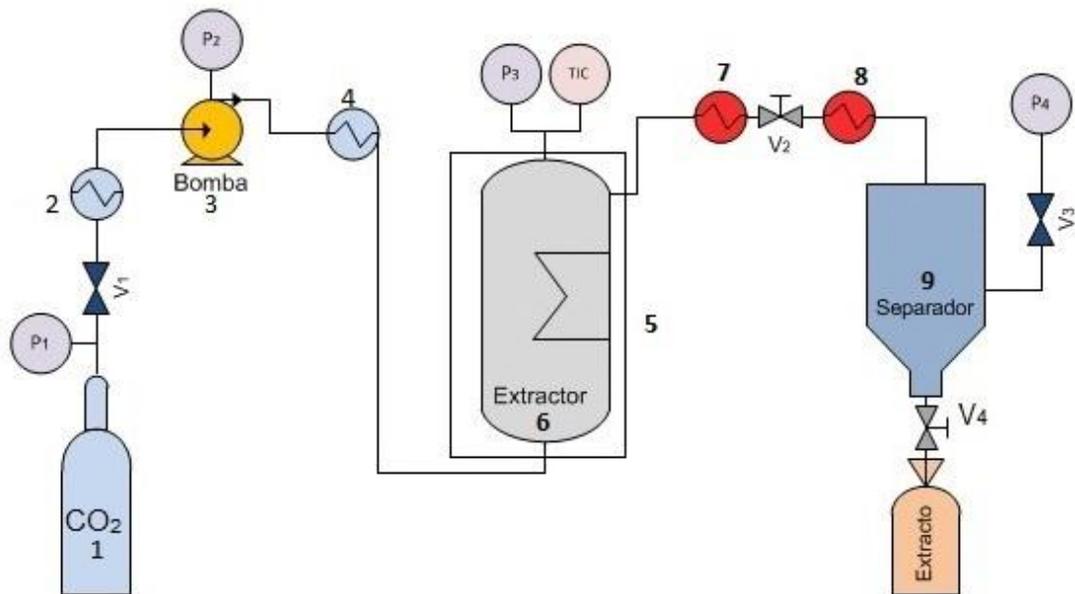
**Tabla 1.4.** Extracción de compuestos bioactivos con fluidos supercríticos.

Compuesto Extraído	Solvente	Condiciones de Extracción			Fuente
		Presión (MPa)	Temperatura (°C)	Flujo	
Extracto de romero (antioxidantes)	CO <sub>2</sub>	10 - 16	37- 47	-	Ibáñez et al., 1999
Carotenoides de paprika	CO <sub>2</sub>	> 50	100	25Kg/h	Ambrogi et al., 2002
Extracto de orégano (antioxidantes)	CO <sub>2</sub> / 4% etanol	25	40	-	Cavero et al., 2006
Vitamina E de germen de trigo	CO <sub>2</sub>	34,5	43	1,7mL/min	Ge et al., 2002
Esteroles y tocoferoles del aceite de oliva	CO <sub>2</sub>	20	40	2L/h	Ibáñez et al., 2002
Flavonoides del jugo de naranja	CO <sub>2</sub>	16	40	2400 mL/h	Señorans et al., 2001

Fuente: Domínguez y Parzanese.<sup>27</sup>

##### 1.4.2.2.1. Descripción del equipo de extracción con FSC

En la Figura 1.3. se muestra un diagrama del equipo de FSC el cual está formado por: (1) un cilindro de almacenamiento de CO<sub>2</sub>, (2) un enfriador, (3) una bomba de alta presión, (4) un baño enfriador, (5) una estufa, (6) un extractor, (7 y 8) resistencias eléctricas, (9) un separador. Además cuenta con (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>) manómetros, (V<sub>1</sub>) una válvula de paso, (V<sub>2</sub>) una válvula micrométrica, (V<sub>3</sub>) una válvula reguladora y (V<sub>4</sub>) una válvula de paso.



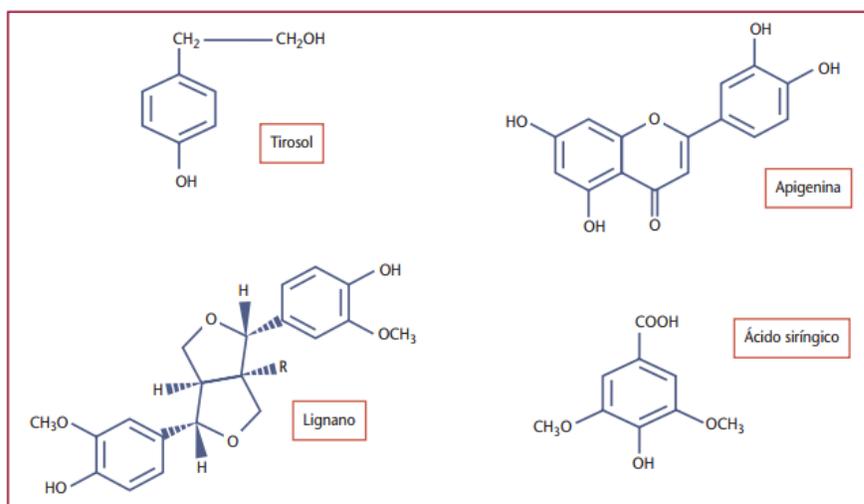
**Figura 1.3.** Diagrama del equipo de FSC. 1. cilindro de CO<sub>2</sub>; 2. enfriador; 3. bomba; 4. baño enfriador; 5. estufa; 6. extractor, 7 y 8. resistencias eléctricas; 9. separador; P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> manómetros; V<sub>1</sub> válvula de paso; V<sub>2</sub> válvula micrométrica; V<sub>3</sub> válvula reguladora y V<sub>4</sub> válvula de paso.

**Fuente:** Basado en el equipo de FSC de la UTPL

El equipo permite alcanzar las condiciones de P y T requeridas para la extracción, haciendo pasar un flujo continuo de CO<sub>2</sub>; el cual arrastrará los componentes de interés hacia el separador.

### 1.5. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles, constituyen un grupo bastante amplio de sustancias químicas, se caracterizan por presentar en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y abarcan a más de 8000 compuestos distintos y han demostrado poseer importante actividad antioxidante.<sup>29, 30</sup> En la Figura 1.3. se muestra algunas estructuras de los compuestos fenólicos más conocidos.



**Figura 1.4.** Estructuras de compuestos fenólicos más conocidos.

**Fuente.** Gimeno.<sup>31</sup>

La actividad antioxidante de los fenoles es el origen de funciones biológicas tales como la antimutagénica, anticancerígena y antienviejeamiento, incluyendo además actividad antibacteriana, antiviral, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antitrombótica y vasodilatadora.<sup>32</sup>

Se ha verificado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia Humana (HIV) y del virus simplex humano (HSV), las glucosil transferasas del *Streptococcus mutans* (caries dental), la autoxidación del ascorbato, también efectos citotóxicos, la promoción del crecimiento tumoral y la enzima xantina mono- amina oxidasa.<sup>33</sup>

### 1.5.1. Compuestos fenólicos del cacao

El cacao está asociado con numerosos beneficios para la salud, sobre todo la mejora de los factores que afectan al sistema cardiovascular<sup>34</sup>; esto se liga a la presencia de flavan-3-ol metabolitos específicamente<sup>35</sup>. El cacao es uno de los alimentos que mayor cantidad de flavonoides contiene, principalmente epicatequina y catequina.<sup>32</sup>

Las clases de compuestos polifenólicos identificados son tales como fenoles simples, benzoquinonas, ácidos fenólicos, acetofenonas, los ácidos fenilacético, ácidos hidroxicinámicos,

cumarinas, cromonas, naftoquinonas, xantonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides, lignanos y ligninas. Tres principales grupos de polifenoles de cacao se pueden distinguir: catequinas (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%).<sup>5</sup> La catequina principal es (-)-epicatequina con hasta 35% de contenido de polifenoles.<sup>36</sup>

## **1.6. Antioxidantes**

Los antioxidantes son sustancias fabricadas naturalmente por el organismo o se encuentran en los alimentos.<sup>37</sup>

Su función primordial es proteger el organismo del daño oxidativo que causan moléculas conocidas como radicales libres<sup>38</sup>; dicho daño oxidativo es el responsable de importantes enfermedades de carácter degenerativo del sistema circulatorio, enfermedades cardiovasculares, envejecimiento precoz y cáncer, todas las cuales hoy son la principal causa de muerte en nuestra sociedad.<sup>39,40</sup>

Estudios realizados por Padilla et al.<sup>41</sup> indican que en semillas de cacao la actividad antioxidante fue de 89.69% expresada en coeficiente de (AA). Según estudios de Amin et al.<sup>42</sup> muestran un 98.4% de actividad antioxidante.

### **1.6.1. Determinación de actividad antioxidante**

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. El método *in vitro* es el más utilizado, el cual consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada.<sup>43</sup>

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante se basan en distintos sistemas generadores de radicales libres. Dichos radicales reaccionarían con la muestra y en virtud de la capacidad antioxidante de ésta se inhibiría la generación de los mismos. En la actualidad, debido a la complejidad de los procesos de oxidación, no existe un método que refleje de forma

completa el perfil antioxidante de una muestra, por tanto, es bueno trabajar con varios métodos para facilitar la comparación e interpretación de los resultados.<sup>44</sup>

Entre los métodos más utilizados están:

**ABTS** El radical  $ABTS^{\bullet+}$  se genera a partir de su precursor el ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico (ABTS).<sup>45</sup> El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y con un espectro de absorción en el UV-visible. Es un radical artificial que no mimetiza bien la situación *in vivo*, termodinámicamente puede ser reducido por compuestos que tengan un potencial redox menor que el del ABTS (0.68V), pudiendo reaccionar con el radical.<sup>46</sup>

**DPPH** el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) fue uno de los primeros radicales sintéticos utilizados para estudiar la relación estructura-actividad de los antioxidantes fenólicos. El método se basa, en el descenso de absorbancia a 517 nm, asociado a la desaparición de la forma radical del DPPH, de los medios de reacción provocada por antioxidantes.<sup>46</sup>

**FRAP** en este método se determina la capacidad antioxidante de forma indirecta. Se basa en el poder que tiene una sustancia antioxidante para reducir el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  que es menos oxidante. El complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro es reducido al complejo ferroso coloreado; es método espectrofotométrico ya que se mide la absorbancia del  $Fe^{2+}$ . Así, cuanto más antioxidante es la sustancia objeto de estudio, mayor es la reducción y mayor la concentración de  $Fe^{2+}$  y más alta la señal de absorbancia.<sup>46</sup>

### **1.7. Determinación de fenoles totales**

Fenoles totales, permite conocer la cantidad de fenoles de una forma general. Folin-Ciocalteu, ha sido utilizado durante muchos años como una medida del contenido en compuestos fenólicos totales en productos naturales.<sup>46</sup> Este método utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu (solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfowolfrámico) que oxida los compuestos polifenólicos a fenolatos en medio alcalino, formando un complejo de molibdeno–tungsteno de color azul.<sup>47,48</sup>

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **2.1. Materiales**

### **2.1.1. Reactivos**

Los solventes utilizados para la extracción, determinación de fenoles totales y capacidad antioxidante fueron:

SFE y Soxhlet: CO<sub>2</sub> grado alimenticio (Indura), Hexano (Merck) y Metanol (Panreac Química S.A.)

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

ABTS: 2, 2-azinobis (3 – etilbenzotiazolina - 6 – ácido sulfónico) (Sigma), persulfato de potasio (Sigma - Aldrich), ácido- 6 - hidroxil - (2, 5, 7, 8 tetrametilcromano - 2 - carboxílico) trólox (Aldrich Chemistry).

DPPH: 2, 2 difenil - 1 - picryldrazil (Sigma), ácido - 6 -hidroxil - (2, 5, 7, 8 tetrametilcromano - 2 - carboxílico) trólox (Aldrich Chemistry).

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

### **2.1.2. Muestra**

Se utilizó como materia prima la cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.); proveniente de la empresa Kallari (Napó - Ecuador) Figura 2.1.



**Figura 2.1.** Ubicación de la Asociación Kallari en el mapa del Ecuador.

**Fuente.** Kallari.<sup>49</sup>

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Preparación de la materia prima**

La muestra fue deshidratada en una estufa Memmert a una temperatura de 50 – 60 °C, por 24 horas aproximadamente hasta una humedad menor al 10% (norma INEN 173)<sup>50</sup>; para evitar el deterioro de la muestra y facilitar la trituración de la misma. Esta fue triturada en un molino manual Corona hasta que fue posible ser tamizada Figura 2.2. a un tamaño de partícula entre 350 y 250  $\mu\text{m}$  (Anexo A).

### **2.2.2. Obtención de extractos lipofílicos.**

#### **2.2.2.1. Extracción con fluidos supercríticos.**

Para obtener los extractos se utilizó el equipo de fluidos supercríticos que se muestra en la Figura 2.1. Se usó CO<sub>2</sub>-SC a dos temperaturas 35 y 40 °C; cada una de estas a 150 y 200 bares de presión respectivamente; utilizando un flujo continuo de 10000 ml/min; el tiempo de extracción fue de 3 horas (Anexo A).

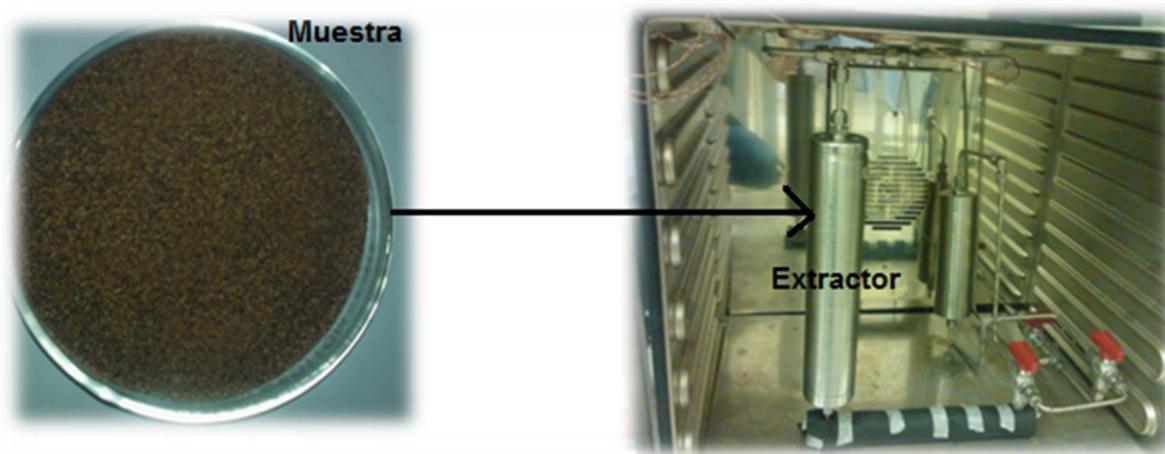


**Figura 2.2.** Equipo de FSC de la UTPL. 1. Cilindro de CO<sub>2</sub>, 2. Enfriador, 3. Bomba, 4. Baño enfriador, 5. Estufa, 6. Panel de control, 7 y 8. Resistencias eléctricas, 9. Separador, 10. Contador de CO<sub>2</sub>, V<sub>1</sub> válvula de paso, V<sub>2</sub> válvula micrométrica, P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> manómetros.

**Fuente.** Autora.

Para el uso del equipo se debe asegurar que la temperatura del baño enfriador (Sección 4) de la Figura 2.2; este a una temperatura entre  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura suficiente para evitar la cavitación de la bomba, durante el tiempo de extracción.

En el extractor de 100 ml de capacidad; se coloca de 20 a 22 g de muestra (cáscara de cacao). Figura 2.3. El extractor es colocado dentro de la estufa (Sección 5); cabe mencionar que es en el extractor donde se controla tanto la presión ( $P_3$ ), como la temperatura.



**Figura 2.3.** Muestra de cáscara de cacao y extractor de 100 ml de capacidad del equipo de FSC.

**Fuente.** Autora.

Para iniciar la extracción se realiza la presurización del sistema, abriendo la válvula del tanque de  $\text{CO}_2$  (Sección 1). La bomba de alta presión (Sección 3) nos permite llegar a las condiciones requeridas (150 - 200 bares) y con la estufa (Sección 5) se regula la temperatura ( $35 - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ); al llegar a estas condiciones se abre la válvula micrométrica ( $V_2$ ), para que el flujo de  $\text{CO}_2$  pase y permita el paso continuo del mismo hacia la muestra; y pueda arrastrar el extracto, al separador (Sección 9).

Una vez que las condiciones estén constantes se abre la válvula reguladora ( $V_3$ ), para incrementar la presión en el separador (Sección 9),  $P_4$  debe ser 30 bares; el  $\text{CO}_2$  a esta presión se encuentra en estado de gas permitiendo que el extracto se separe y quede en el separador, mientras que el  $\text{CO}_2$  va a la atmósfera.

A partir de ese momento se empieza a contar el tiempo de 3 horas; durante este periodo las condiciones deben mantenerse constantes; para ello se controla el flujo de  $\text{CO}_2$  manipulando ( $V_2$ ) para evitar que aumente o disminuya el flujo del gas; la bomba (Sección 3) para aumentar o disminuir la presión; las resistencias (Sección 7 y 8) deben ser calentadas de tal manera que no se permita la congelación de ( $V_2$ ) por el efecto de Joule – Thomson; que consiste en el cambio de temperatura durante el proceso de expansión adiabático de un gas.<sup>51</sup>

Pasado las 3 horas de extracción se despresuriza el equipo, para ello se empieza cerrando (Sección 1), se apaga (Sección 3), dejando así que el  $\text{CO}_2$  acumulado en el sistema vaya saliendo y la presión disminuya; cuando los barómetros estén en cero se desarma el equipo (extractor, separados y tuberías).

El extracto obtenido Figura 2.4 se coloca en viales, se almacena a  $-4\text{ }^\circ\text{C}$  hasta sus respectivos análisis.



**Figura 2.4.** Extracto obtenido utilizando  $\text{CO}_2\text{-SC}$  a partir de cáscara de cacao.

**Fuente.** Autora.

Así mismo del extractor, se saca la muestra agotada, se pesa y se almacena; esto nos permite conocer los rendimientos los cuales fueron calculados con la siguiente expresión Ecuación (1).

$$\%Rendimiento = \frac{\text{Peso del extracto}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

#### **2.2.2.2. Extracción por el método Soxhlet.**

Se pesó 10 g de muestra de cáscara de cacao colocados en un cartucho, estos fueron puestos en el equipo Soxhlet agregándoles 250 ml de hexano, se dejó sifonear por un período de 3 horas para llevar a cabo la extracción, pasado este tiempo se recupera el disolvente por evaporación rotatoria obteniéndose el extracto. Los rendimientos de extracción fueron calculados con la Ecuación 1.

Se hizo repeticiones por triplicado; una vez obtenidos los extractos se realizaron los respectivos análisis.

#### **2.3. Determinación de fenoles totales**

Para la determinación del contenido de fenoles totales se realizó el método de Folin-Ciocalteu descrito por Thaipong et al.<sup>52</sup> En el cual se emplea una curva estándar (0 - 0.1 mg/L) de una solución patrón de ácido gálico (Anexo B). Se mezcla en un vial 150 µL de muestra, 2400 µL de agua y 150 µL de Folin-Ciocalteu 0.25N. Agitar por 5 minutos en el vortex y dejar reaccionar por 3 min, finalmente agregar 300 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1N y reposar en oscuridad, a temperatura ambiente por 2 horas. Leer absorbancias a 725 nm. Los resultados serán expresados en mg equivalente de ácido gálico por 100 gramos de muestra (mg de GAE/100 g MS) (Anexo A).

#### **2.4. Determinación de actividad antioxidante**

Antes de tomar las alícuotas de la muestra para cada método sonicar hasta su completa disolución por un tiempo mínimo de 15 min.

##### **2.4.1. Método ABTS**

Se realizó el procedimiento descrito por Arnao et al. con modificaciones de Thaipong et al.<sup>53</sup>. Se prepara una solución patrón (SP) que consiste en 7.4 mM de ABTS y 2.6 mM de persulfato de

potasio se mezclan y se dejan reaccionar por 12 horas. Para la solución de trabajo (ST) se toma 1 ml de SP más 60 ml de metanol, ajustar hasta una absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$  leídos a 734 nm. Se emplea una curva estándar (25 – 600  $\mu\text{M}$ ) de Trólox (Anexo B). Se coloca 150  $\mu\text{L}$  de cada muestra, más 2850  $\mu\text{L}$  de ST; dejar reposar por 2 horas y leer a absorbancia de 734 nm. El resultado se expresa en  $\mu\text{mol}$  de Trólox/g MS (Anexo A).

#### **2.4.2. Método DPPH**

Este método se basó en la técnica de Bran-Williams et al. con modificaciones descritas por Thaipong et al.<sup>53</sup> La solución patrón (SP) se realiza disolviendo 24 mg de DPPH y en 100 ml de metanol, se refrigera a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta utilizar. La solución de trabajo (ST) se obtiene al mezclar 10 ml de SP con 45 ml de metanol, leer a 515 nm hasta ajustar absorbancia de  $1.1 \pm 0.02$ . Se emplea una curva estándar de (25 – 800  $\mu\text{M}$ ) de Trólox (Anexo B). Se toma 150  $\mu\text{L}$  de muestra, 2850  $\mu\text{L}$  de ST de DPPH, reposar por 30 min en la oscuridad y leer absorbancias a 515 nm. El resultado se expresa en  $\mu\text{mol}$  de Trólox/g MS (Anexo A).

#### **2.4.3. Método FRAP**

Se lo realizó basándose en método descrito por Benzie et al. con modificaciones de Thaipong et al.<sup>53</sup> Se emplea una curva estándar de (25 – 800  $\mu\text{M}$ ) de Trólox. La solución patrón (SP) incluye una solución de buffer acetato a 300 mM (3.1 g  $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y 16 ml  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ), pH 3.6, solución TPTZ (2, 4, 6- tripyridyl-s-triazine) a 10 mM, una solución de HCl a 40 mM, y una solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20mM. Calentar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Colocar 150  $\mu\text{L}$  de muestra y 2850  $\mu\text{L}$  de ST, dejar reposar por 30 min y leer su absorbancia a 593 nm. El resultado se expresa en  $\mu\text{mol}$  de Trólox/g de MS (Anexo A).

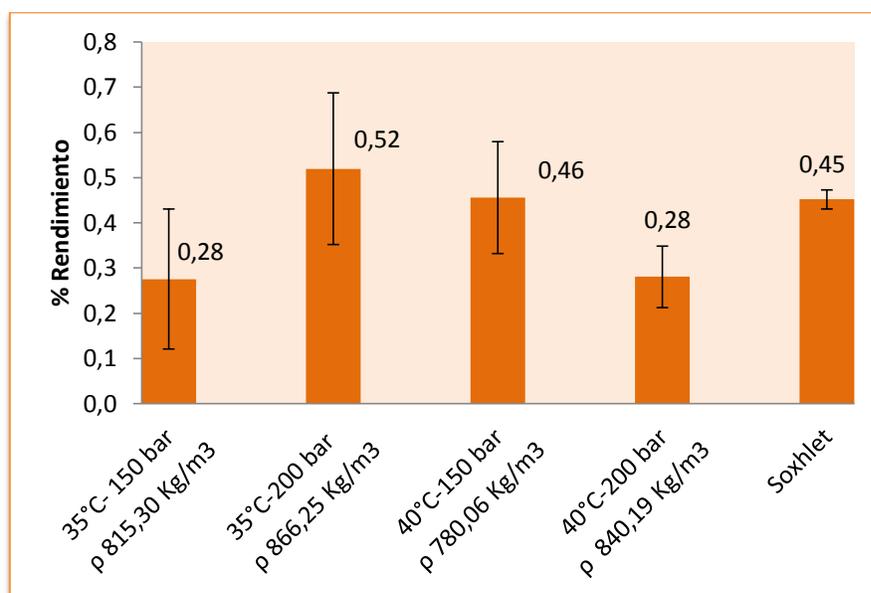
### **2.5. Análisis Estadístico**

Se evaluó el rendimiento, fenoles totales y capacidad antioxidante (ABTS, DPPH y FRAP); por medio de un ANOVA empleando MINITAB 15 con licencia académica con un nivel de significancia de 95% ( $p < 0.05$ ). Como método de comparación entre los tratamientos se realizó el Test de Tukey.

### **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### 3.1. Rendimientos de extracción.

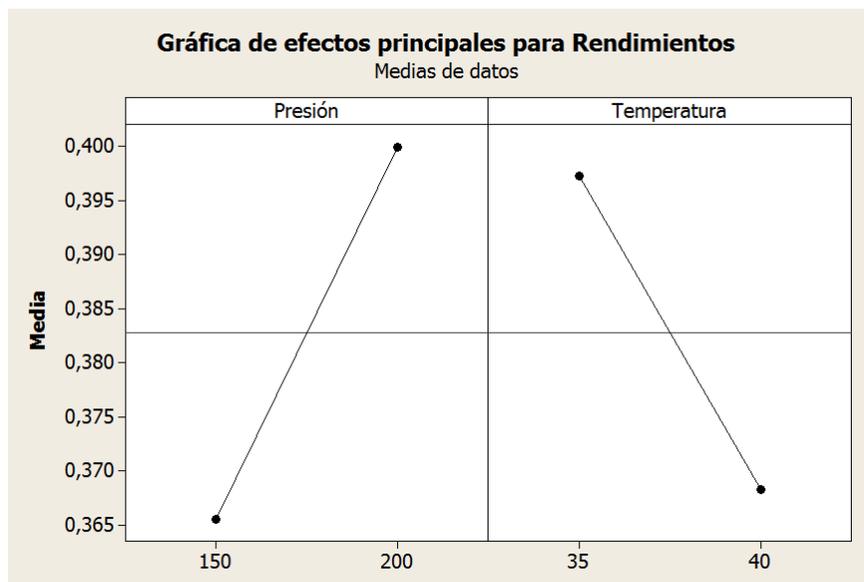
Los resultados de rendimientos de extracción se encuentran en un rango de 0.28 a 0.52% w/w (Anexo C); como se indica en la Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Resultados de rendimientos de extracción a diferentes condiciones utilizando FSC y soxhlet. p: densidad del CO<sub>2</sub> para cada tratamiento.  
**Fuente.** Autora.

Durante el proceso de extracción fue necesario tener mucho cuidado en el control de las condiciones utilizadas; cabe mencionar que el equipo de extracción supercrítica utilizado presentó inconvenientes en la estabilidad de la presión, durante el periodo de extracción. Esto crea inestabilidad de las fases del solvente, siendo esta una de las desventajas de los FSC<sup>54</sup>; generando cambios en la densidad del CO<sub>2</sub>, provocando menor arrastre en la extracción.

En la Figura 3.2. y Figura 3.3.; se observa que hay un valor mayor de rendimiento de extracción en condiciones 35 °C – 200 bar y 40 °C - 150 bar, sin embargo no se encontró efecto de las condiciones de extracción sobre el rendimiento  $p > 0.05$  (Anexo D).

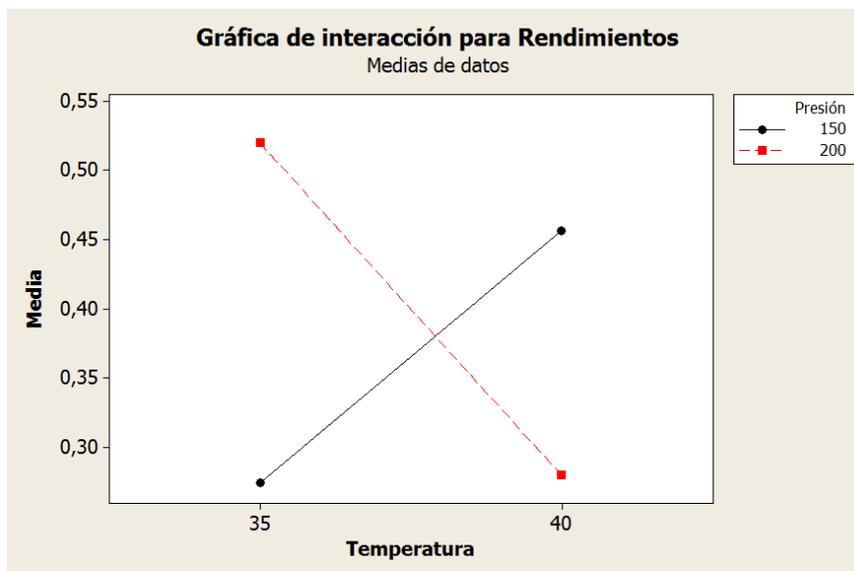


**Figura 3.2.** Gráfica de efectos principales de las condiciones de P y T sobre el rendimiento en FSC.

**Fuente.** Autora.

Quintero and Marquina<sup>55</sup> mencionan que el efecto de la presión es aumentar el rendimiento de extracción; ya que si se incrementa la presión también aumenta la densidad del CO<sub>2</sub> y con ella la capacidad del solvente supercrítico; así mismo el tiempo de extracción es un factor importante para el incremento del rendimiento. Fernández<sup>56</sup>, Dionisi et al.<sup>57</sup> y Wei et al.<sup>58</sup> corroboran en sus estudios que al aumentar la presión y temperatura se incrementa el rendimiento de extracción.

En cambio Reyes et al.<sup>59</sup> señalan en su estudio que en condiciones altas de presión y bajas de temperatura se da un mayor rendimiento de extracción. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en la investigación, donde se comprueba que al aumentar P, se incrementa la densidad del fluido; así mismo al disminuir T, la densidad incrementa.



**Figura 3.3.** Gráfica de interacción de las condiciones de P y T sobre el rendimiento en FSC.

**Fuente.** Autora.

Al no existir diferencias significativas se seleccionó como las mejores condiciones de extracción 150 bar de P y 40 °C de T debido a la facilidad para llegar a estas condiciones, estabilidad de las mismas durante el tiempo de extracción y los rendimientos obtenidos tienen menor coeficiente de variación; además el rendimiento alcanzando (0.46%) es igual al obtenido por el método soxhlet.

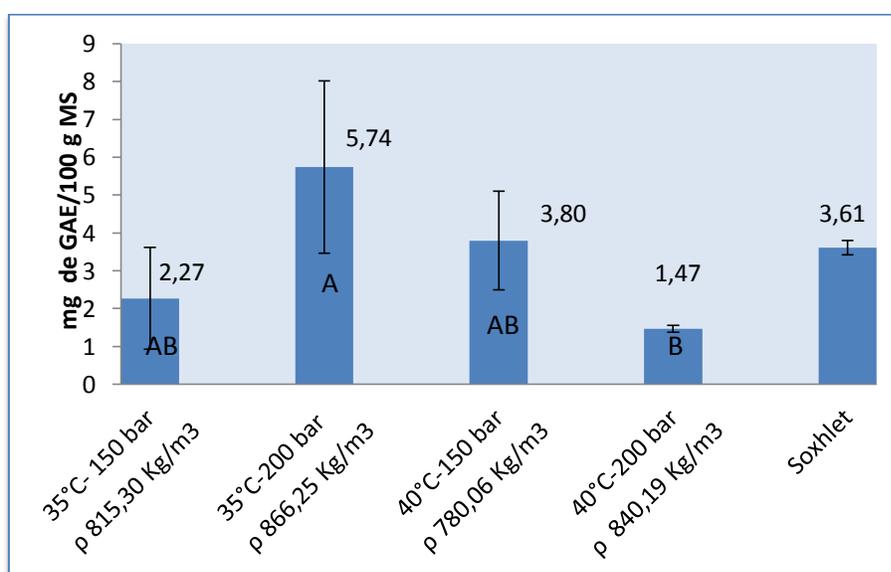
No se encontró estudios realizados en subproductos de cacao, pero comparado con estudios realizado por Shufen et al.<sup>60</sup> en extracción de manteca de cacao utilizando CO<sub>2</sub>-SC en condiciones de 40 °C y 150 bar obtiene un rendimiento del 0.2% siendo este menor al obtenido en la presente investigación.

Babovic et al.<sup>61</sup> en su estudio de extracción de compuestos de mayor volatilidad en romero y tomillo obtuvieron rendimientos de 0.67%, 0.75% respectivamente en condiciones de 40 °C – 120 bar. Mendiola et al.<sup>62</sup> en su estudio de extracción en microalgas para el enriquecimiento de vitamina E encontraron valores de 0.58% en condiciones de extracción de 55 °C y 220 bar. Al hacer otra comparación con semillas de cilantro Yopez et al.<sup>63</sup> obtuvieron un rendimiento de 0.88% en condiciones de 37 °C y 180 bar de presión. Navarro<sup>64</sup> en extracción de aceite de ajeno en condiciones de 40 °C y 138 bar el rendimiento es 2.26%. Estos autores obtienen

rendimientos mayores a lo investigado en el presente estudio, debido a que utilizan diferentes tipos de muestra, condiciones y tiempos de extracción factores importantes que influyen en el rendimiento. Sin embargo, de forma general los rendimientos de extracción de compuestos bioactivos son bajos.

### 3.2. Fenoles totales

El contenido de fenoles totales obtenido en cáscara de cacao (Anexo C); se encuentra en un rango de 1.47 a 5.74 mg GAE/100 g MS, como se muestra en la Figura 3.4.



**Figura 3.4.** Resultados del contenido de fenoles totales a diferentes condiciones.  
Fuente. Autora.

Prueba de medias de comparación de Tukey, las barras que no comparten una letra son significativamente diferentes. p: densidad del CO<sub>2</sub> para cada tratamiento.

El contenido de fenoles totales se ve afectado de las condiciones de extracción  $p < 0.05$  (Anexo D); el test de Tukey (Anexo D) nos muestra que los tratamientos de 35 °C - 150 bar y 40 °C - 150 bar no son diferentes significativamente; mientras que entre los tratamientos de 35°C - 200 bar y 40 °C - 200 bar si existen diferencias significativas.

Se escoge como mejor condición de extracción 35 °C - 200 bar ya que con ella se obtiene el mayor contenido de fenoles totales teniendo como resultado 5.74 mg de GAE/100 g MS, siendo este mayor en un 59.3% al obtenido por el método soxhlet.

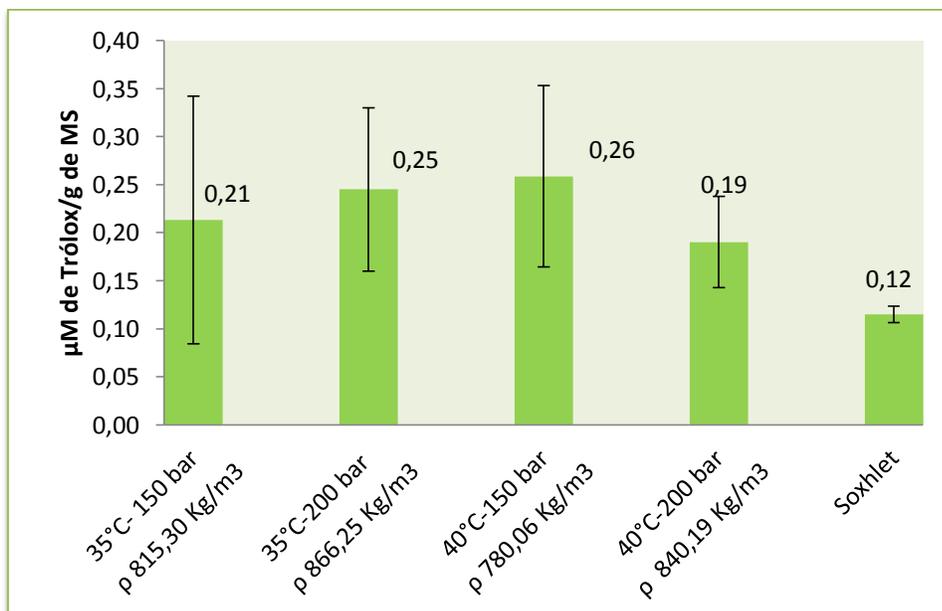
Comparado con un estudio realizado por Padilla et al.<sup>41</sup> en granos de cacao encontró un valor de 6.66 mg de GAE/100 g MS.

La concentración de fenólicos totales es mayor al incrementar la presión; esto concuerda con estudios de otros productos donde mencionan que al aumentar la polaridad del solvente mediante la presión la concentración de fenoles totales aumenta.<sup>65</sup> Castro et al.<sup>66</sup> en su estudio demuestran que las condiciones de presión al ser aumentadas estas incrementan el contenido de fenoles totales, esto coincide con Murga et al.<sup>67</sup> en su investigación.

### 3.3. Actividad Antioxidante

#### 3.3.1. ABTS

Los resultados obtenidos de capacidad antioxidante medidos por el método ABTS en cáscara de cacao (Anexo C), se presenta en la Figura 3.5; esta capacidad se encuentra en un rango entre 0.19 a 0.26  $\mu\text{M}$  de Trólox/g MS.



**Figura 3.5.** Resultados de capacidad antioxidante por el método ABTS en  $\mu\text{M}$  de Trólox/g de MS de cada condición utilizada en FSC y soxhlet.  $\rho$ : densidad del  $\text{CO}_2$  para cada tratamiento.

**Fuente.** Autora.

El análisis estadístico para la actividad antioxidante por el método ABTS (Anexo D)  $p > 0.05$  indica que las condiciones de extracción no tienen efecto de capacidad antioxidante sobre el método.

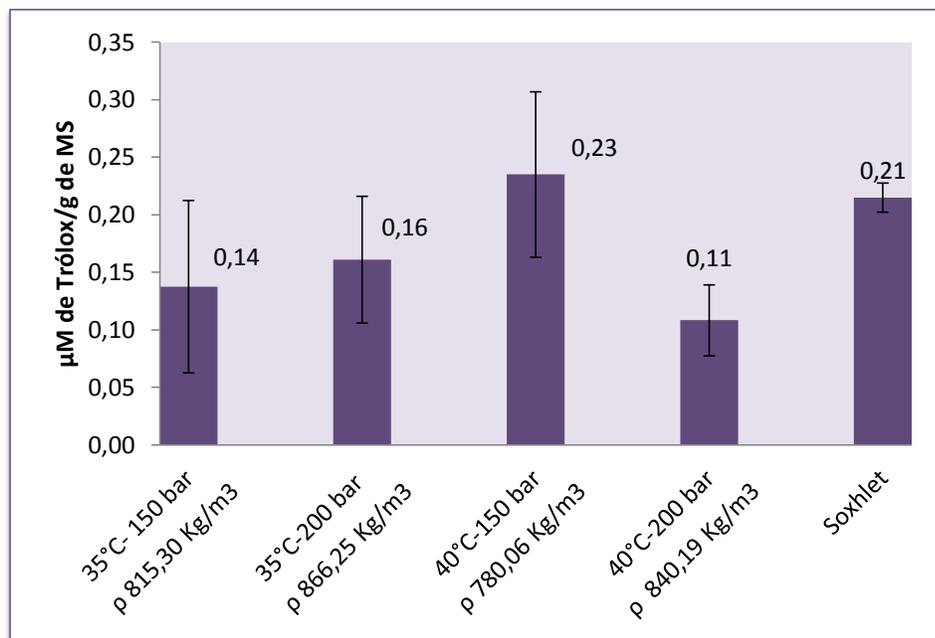
Si comparamos cada tratamiento con el método Soxhlet el contenido de actividad antioxidante aumenta favorablemente en un 77 % en condiciones de 35 °C - 150 bar; 104 % con las variables de 35 °C - 200 bar; 115 % en condiciones 40 °C - 150 bar y en un 58 % en condiciones de 40 °C - 200 bar.

Se escogió como la mejor condición 40 °C - 150 bar, debido a que existe mayor facilidad para mantenerlas estables; con estas condiciones podemos observar que existe un aumento de concentración de capacidad antioxidante con respecto al obtenido por el método soxhlet.

Luu Thai Danh et al.<sup>68</sup> mencionan que combinando altas presiones, temperatura y tiempos largos se obtiene mayor capacidad antioxidante, lo que es similar a lo estudiado donde a altas presiones se obtiene mayor capacidad antioxidante.

### **3.3.2. FRAP**

En la Figura 3.6. se muestra que los resultados obtenidos de capacidad antioxidante en cáscara de cacao por el método FRAP, se encuentran un rango de 0.11 a 0.23  $\mu\text{mol}$  de Trólox/g MS. (Anexo C).



**Figura 3.6.** Resultados del método FRAP en  $\mu\text{M}$  de Trólox/g de MS de cada condición utilizada en FSC y soxhlet.  $\rho$ : densidad del  $\text{CO}_2$  para cada tratamiento.

**Fuente.** Autora.

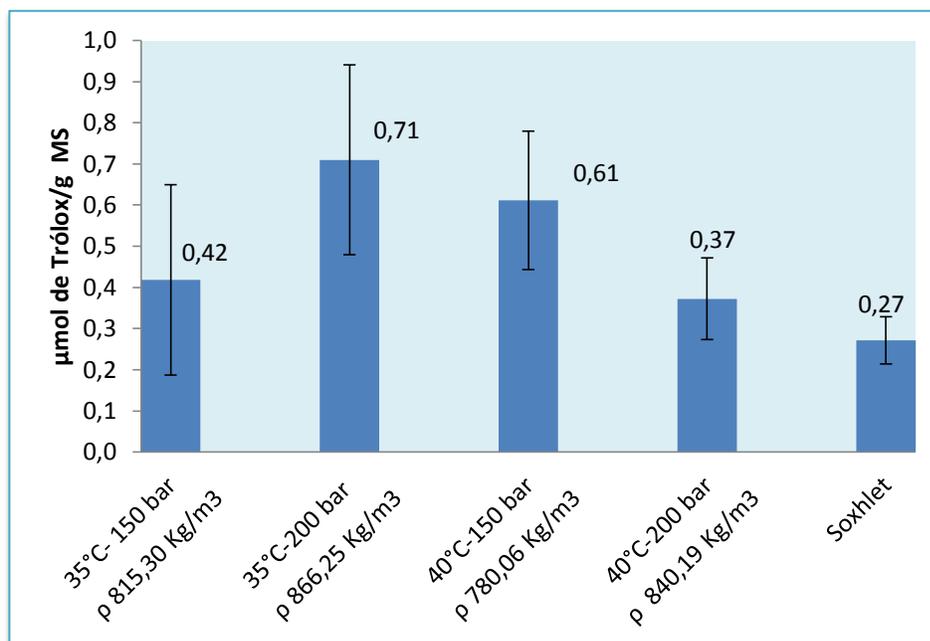
Para el método FRAP ( $p > 0.05$ ) no existen diferencias significativas (Anexo D), las condiciones de extracción no muestran efecto sobre la capacidad antioxidante.

La concentración obtenida de actividad antioxidante por el método FRAP en condiciones de  $35^\circ\text{C} - 150$  bar,  $35^\circ\text{C} - 200$  bar y  $40^\circ\text{C} - 200$  bar es baja en comparación a la alcanzada por el método soxhlet; mientras que en condiciones de  $40^\circ\text{C} - 150$  bar es similar; por esta razón se toma como mejores condiciones así mismo con las mismas hay mayor estabilidad durante el proceso.

Wang et al.<sup>69</sup> en su estudio indican que existe mayor concentración de capacidad antioxidante a altas presiones, lo que es contrario al presente estudio donde a la presión más baja se encontró mayor capacidad antioxidante.

### 3.3.3. DPPH

La concentración de actividad antioxidante en cáscara de cacao por el método DPPH se encuentra en un rango de 0.37 a 0.71  $\mu\text{mol}$  de Trólox/g MS (Anexo C); como se muestra en la Figura 3.7.



**Figura 3.7.** Resultados de capacidad antioxidante por el método DPPH en  $\mu\text{mol}$  de Trólox/g de MS de cada condición utilizada en FSC y soxhlet.  
 $\rho$ : densidad del  $\text{CO}_2$  para cada tratamiento .

**Fuente.** Autora.

Para el método DPPH no hay diferencias significativas de las condiciones sobre la capacidad antioxidante  $p > 0.05$  (Anexo D).

El contenido de actividad antioxidante por el método DPPH en condiciones de 35 °C - 150 bar, 35 °C - 200 bar, 40 °C - 150 bar y 40 °C - 200 bar aumenta favorablemente en un 55 %, 162 %, 126 % y 37 % respetivamente comparado con el alcanzado por el método soxhlet.

Se escogió como mejor tratamiento las condiciones de 40 °C - 150 bar, debido a que aumento del contenido de actividad antioxidante con respecto al método soxhlet y estabilidad de estas condiciones durante el proceso de extracción.

Algunos autores mencionan, que a mayor presión se obtiene una concentración más alta de actividad antioxidante, en condiciones fijas de presión y temperatura esto es señalado por Quihui et al.<sup>70</sup>, Castro et al.<sup>66</sup>; Gelmez et al.<sup>71</sup> y Babovic et al.<sup>61</sup> en sus investigaciones, lo que concuerda con lo investigado ya que la capacidad antioxidante es alta a mayor presión en el método DPPH.

Si se compara la fracción lipofílica con la fracción hidrofílica de cáscara de cacao, obtenida mediante otro tipo de extracción, esta indica baja capacidad antioxidante; Martínez et al.<sup>6</sup> encontraron valores que oscilan entre 2.48 a 22.93  $\mu\text{mol}$  de Trólox/ g en el ensayo ABTS; 0.67 y 4.69  $\mu\text{mol}$  de Trólox/ g de muestra en el ensayo FRAP y 1.57 a 33.93  $\mu\text{mol}$  de Trólox/ g de muestra en el ensayo de DPPH, siendo estos altos en comparación la presente estudio. Así mismo si se compara con otro producto como guayaba, Barquera et al.<sup>72</sup> obtuvieron valores entre 682.1 a 845.9  $\mu\text{mol}$  de Trólox/ g de muestra en el ensayo ABTS y 416.3 a 562.4 en el ensayo FRAP; siendo estos valores mayores a los encontrados en el presente estudio.

Debido al tipo de matriz utilizada, además emplean otros tipos de extracción como maceración dinámica y tiempos más largos.

## CONCLUSIONES

- ✓ La fracción lipofílica no presenta alta actividad antioxidante.
- ✓ No hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) de las condiciones de extracción sobre el rendimiento. Obteniendo un rendimiento de 0.28 - 0.52%.
- ✓ El mejor contenido de fenoles totales en la fracción lipofílica de cáscara de cacao es de 5.74 mg de GAE/ 100 g MS, en condiciones de 200 bar de presión y 35 °C de temperatura.
- ✓ La capacidad antioxidante no se ve afectada por las condiciones de extracción utilizadas ( $p > 0.05$ ), obteniendo como resultado 0.19 - 0.26, 0.11 - 0.23 y 0.37 - 0.71  $\mu\text{M}$  de Trólox/g de MS en los tres métodos empleados ABTS, FRAP y DPPH respectivamente.
- ✓ La extracción con fluidos supercríticos mejora el contenido de fenoles totales y de capacidad antioxidante frente a un método convencional como es la extracción soxhlet; a pesar que el rendimiento obtenido es similar al Soxhlet, el contenido de fenoles totales aumenta un 59.3% y capacidad antioxidante es mayor en un 115 % ABTS, 11 % FRAP, 126 % DPPH.

## RECOMENDACIONES

- ✓ Para conocer la composición y pureza de la fracción lipofílica de los extractos obtenidos realizar un cromatografía de HPLC.
- ✓ Se recomienda seguir con el estudio de la fracción hidrofílica con la ayuda de un co-solvente para conocer si la misma presenta alta riqueza de compuestos antioxidantes.
- ✓ Realizar una cinética de extracción para conocer cual es el mejor tiempo de extracción.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Asociación Nacional Ecuatoriana de Cacaoteros (ANECACAO). Cacao en Ecuador <http://www.anecacao.com/index.php/es/cacao-en-ecuador.htm> (accessed Nov 26, 2013).
- (2) Moulay, L.; Sniderman, Z.; Ibarra, A.; Marti, V. Method of preparing a highly-soluble cocoa extract. WO 2006/117416 A1. España, 2006.
- (3) Murillo, I. Evaluación de 2 dietas experimentales con diferentes niveles de cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) en las fases de crecimiento y acabado de cuyes (*Cavia porcellus* L.) de Raza Andina. Título en Ingeniero Químico. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador, 2006.
- (4) Barazarte, H.; Sangronis, E.; Unai, E. La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* **2008**, 58, 1.
- (5) Hii, C.; Law, C.; Suzannah, S.; Misnawi; Cloke, M. Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* **2009**, 2, 702–722.
- (6) Martínez, R.; Torres, P.; Meneses, M.; Figueroa, J.; Pérez, J.; Viuda, M. Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International* **2012**, 39–45.
- (7) Robinson, T.; Ranalli, A.; Phillips, A. Cocoa polyphenols, changes in Cocoa tannins during processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1961**, 9, 295–298.
- (8) Gil, J. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Masterado en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Antioquia. Colombia 2012, Vol. 16, p. 21.
- (9) Zaidul, I.; Norulaini, N.; Mohd, A.; Smith, R. Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) extraction and fractionation of palm kernel oil from palm kernel as cocoa butter replacers blend. *Journal of Food Engineering* **2006**, 73, 210–216.
- (10) Velasco, R.; Villada, H.; Carrera, J. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica* **2007**, 18, 53–65.
- (11) Sánchez, F.; Garcés, F. Monilophthora roreri ( Cif y Par ) Evans et al. en el cultivo de cacao. *Scientia Agropecuaria* **2012**, 3, 249–258.
- (12) Crozier, A.; Ashihara, H.; Barbéran, F. *Teas, Cocoa and coffee*. Professor Alan Crozier, Professor Hiroshi Ashihara, Ed.; Primera.; A John Wiley y Sons, Ltd., Publication. España, 2012.

- (13) EruditosWiki. Características de la planta de cacao. [http://www.eruditos.net/mediawiki/index.php?title=Caracter%C3%ADsticas\\_de\\_la\\_planta\\_de\\_cacao](http://www.eruditos.net/mediawiki/index.php?title=Caracter%C3%ADsticas_de_la_planta_de_cacao) (accessed Aug 19, 2014).
- (14) Batista, L. *El Cultivo de Cacao*; CEDAF, Ed.; Primera. Teófilo Su.; República Dominicana, 2009; p. 10.
- (15) Alaniz, E.; Arvizú, S.; González, K. Producción de postres y vinagres a partir de exudado de cacao en la cooperativa de servicios múltiples. "Ríos de agua viva , 21 de Junio, Municipio Rancho Grande Matagalpa". Título en Ingeniería Agroindustrial. Universidad Nacional de Ingeniería. Sede Regional del Norte. Recinto Universitario Augusto C. Sandino. Estelí, 2012, p. 6.
- (16) Suazo, Y. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao Nicaraguense. Masterado en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, 2012.
- (17) Stoler, M. El justo sabor del cacao: Desafíos y ventajas del comercio justo del cacao. Masterado en Relaciones Internacionales. Universidad Andina Simón Bolívar. Ecuador, 2012.
- (18) FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. *Perspectivas a plazo medio de los productos básicos agrícolas*; Roma, 2004; p. 8.
- (19) Centro de Exportación e Inversión de la República Dominicana. *Comportamiento comercial del cacao orgánico*; República Dominicana, 2007; p. 3.
- (20) FEDECACAO. Federación Nacional de Cacaoteros Colombia. Economía, Estadísticas Internacionales <http://www.fedecacao.com.co/site/index.php/1eco-economia>. (accessed Jul 12, 2014).
- (21) Castill, F.; Ramírez, M.; García, R.; Bernla, M.; Aquino, E.; Solís, J.; Durán, C. Reaprovechamiento integral de residuos agroindustriales: cáscara y pulpa de cacao para la producción de pectinas. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias* **2010**, *1*, 45–66.
- (22) Rius, J. Nuevo producto de fibra de cacao a base de cáscara de cacao tostada. ES 2 099 676, España, 1997.
- (23) Conde, E. Revalorización de residuos agroindustriales y forestales para la obtención de antioxidantes naturales con aplicaciones en la industria alimentaria, cosmética y/o farmacéutica. PhD. Dissertation. Universidad de Vigo. Ourense, 2009.
- (24) Peredo, H.; Palou, E.; López, A. Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* **2009**, *3*, 24–32.

- (25) Ordóñez, A.; Rodríguez, I.; Parada, F.; Rojas, N. *Estudio comparativo de la extracción de cafeína con CO<sub>2</sub> supercrítico y acetato de etilo*. Colombia, 2006; pp. 34–42.
- (26) Velásquez, Á. *La tecnología de fluidos supercríticos, un proceso limpio para el sector industrial*. Colombia, 2008.
- (27) Domínguez, L.; Parzanese, M. *Tecnologías para la Industria Alimentaria Fluidos supercríticos*. Argentina, 2010; pp. 1–12.
- (28) Castro, L.; Valcárcel, M.; Cases, M. *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*. Reverte, 1993; p. 480.
- (29) Sotero, V.; Maco, M.; Vela, J.; Merino, C.; Dávila, É.; García, D. Antioxidant evaluation and phenolic compounds in pulp and seeds of four fruits from the *Sterculiaceae* family. *Rev Soc Quím Perú* **2011**, *77*, 66–74.
- (30) 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*. *Journal of Ethno-Pharmacology* **2006**, *108*, 407–413.
- (31) Creus, E. OFFARM. Revista de la Oficina de Farmacia. Compuestos fenólicos. June 2004, pp. 80–84.
- (32) Quiñones, M.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* **2012**, *27*, 76–89.
- (33) Proestos, C.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G.; Komaitis, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1190–1195.
- (34) 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. *Chemistry Central Journal* **2011**, *5*, 53.
- (35) Barberan, F.; Jovellanos, E.; Marín, A.; Muguerza, B.; Gil-Izquierdo, A.; Cerda, B.; Zafrilla, P.; Morillas, J.; Mulero, J.; Ibarra, A.; Pasamar, M.; Ramón, D.; Espín, J. A new process to develop a cocoa powder with higher flavonoid monomer content and enhanced bioavailability in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 3926–3935.
- (36) Ramli, N.; Yatim, A.; Said, M.; Hok, H. HPLC Determination of methylxanthines and polyphenols levels in cocoa and chocolate products. *Malaysian Journal of Analytical Science* **2001**, *7*, 377–386.

- (37) Festy, D. *Antioxidantes. Guía práctica: ¿Qué son? ¿Qué funciones realizan? ¿Qué beneficios aportan?*; LEDUC, S.E., Ed. Primera; MC producc.; Ediciones Robinbook, 2007; p. 256.
- (38) Zheng, W.; Wang, S. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 5165–5170.
- (39) Lambert, J.; Yang, Ch. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2003**, *523-524*, 201–208.
- (40) Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Journal Food and Bioproducts Processing* **2010**, *9*, 217–233.
- (41) Padilla, F.; Rincón, A. Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* **2008**, *58*, 303–308.
- (42) Amin, I.; Cheww, L. Antioxidants effects of extracts of cocoa shell, roselle seeds and a combination of coth extracts on the susceptibility of cooked beef to lipid oxidation. *Journal of Food Technology* **2006**, *4*, 10–15.
- (43) Kuskoski, E.; Asuero, A.; Troncoso, A.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Tecnol. Aliment* **2005**, *25*, 726–732.
- (44) Manach, C.; Williamson, G.; Morand, C.; Scalbert, A.; Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *81*, 230S–242S.
- (45) Tirzitis, G.; Bartosz, G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica* **2010**, *57*, 139–142.
- (46) Prior, R.; Wu, X.; Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4290–4302.
- (47) Chuquimi, F.; Alvarado, A.; Peñarrieta, M.; Bergenståhl, B.; Åkesson, B. Determinación de la capacidad antioxidante y la cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoidicos de cuatro especies vegetales de la región Andina de Bolivia. *Revista Boliviana de Química*. 2008, pp. 75–83.
- (48) Ainsworth, E.; Gillespie, K. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin – Ciocalteu reagent. *Nature Publishing Group*, 2007, *2*, 875–877.

- (49) Kallari. A Cooperative of Kichwa Organic Artists, Cacao Growers&Gourmet Chocolate Makers [http://www.kallari.com/region\\_issues.html](http://www.kallari.com/region_issues.html) (accessed Sep 6, 2014).
- (50) Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN). Determinación de la Humedad. Cacao en grano, 1975, 0173.
- (51) Cuchimaque, J. Evaluación del efecto Joule-Thomson y el Holdup de líquido en sistemas de transporte de gas natural. Título en Ingeniero en Petróleos. Universidad Industrial de Santander, 2006, pp. 1–8.
- (52) Atanassova, M.; Georgieva, S.; Ivancheva, K. Total phenolic and total flavonoid contents , antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* **2011**, 1, 81–88.
- (53) 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. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, 19, 669–675.
- (54) Esquivel, A.; Vargas, P. Uso de aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. *Tecnología en Marcha* **2007**, 20-4-2007.
- (55) Quintero, M.; Marquina, G. *Evaluación del método de extracción supercrítica utilizando CO<sub>2</sub> en la obtención de manteca de cacao*; 2002; Vol. 2, pp. 91–103.
- (56) Fernández, P. *Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico de oleorresina y otras fracciones de pimentón dulce y picante*; España, 2008; Vol. 59, pp. 7–15.
- (57) Dionisi, F.; Hug, B.; Aeschlimann, J. M.; Houllamar, A. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction for total fat analysis of food products. *Journal of Food Science* **1999**, 64, 612–615.
- (58) Xu, W.; Chu, K.; Li, H.; Chen, L.; Zhang, Y.; Tang, X. Extraction of *Lepidium apetalum* seed oil using supercritical carbon dioxide and anti-oxidant activity of the extracted oil. *Journal Open Access Molecules* **2011**, 16, 10029–10045.
- (59) Reyes, A.; Castro, H.; Quijano, C. Obtención de extractos de jengibre (*Zingiber officinale*) empleando CO<sub>2</sub>. *Revista de Ciencia Academica Colombia* **2011**, 136, 381–385.
- (60) Shufen, L.; Stanley, H. A New Industrial Process for Extracting Cocoa Butter and Xanthines with Supercritical Carbon Dioxide. **1996**, 73, 423–429.
- (61) Babovic, N.; Djilas, S.; Jadranin, M.; Vajs, V.; Ivanovic, J.; Petrovic, S.; Zizovic, I. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected *Lamiaceae* herbs and their antioxidant capacity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **2010**, 11, 98–107.

- (62) Mendiola, J.; García, D.; Rupérez, J.; Álvarez, P.; Reglero, G.; Cifuentes, A.; Barbas, C.; Ibañez, E.; Señoráns, F. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. *The Journal of Supercritical Fluids* **2007**, *43* (2008).
- (63) Yepez, B.; Espinosa, M.; López, S.; Bolaños, G. Producing antioxidant fractions from *Herbaceous matrices* by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equilibria* **2002**, *194-197*, 879–884.
- (64) Navarro, L. Extracción con fluidos supercríticos de ajeno (*Artemisia absinthium* L.). *The Journal of Supercritical Fluids* **2012**.
- (65) Goli, A.; Barzegar, M.; Sahari, M. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Journal Food Chemistry* **2005**, *92*, 521–525.
- (66) 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. *The Journal of Supercritical Fluids* **2010**, *51*, 319–324.
- (67) Murga, R.; Sanz, T.; Beltra, S.; Cabezas, L. Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* **2002**, *23*, 113–121.
- (68) Thai, L.; Duy, N.; Triet, A.; Thi, L.; Han, N.; Zhao, J.; Mammucari, R.; Foster, N. Antioxidant activity, yield and chemical composition of lavender essential oil extracted by supercritical CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids* **2012**, *70*, 27–34.
- (69) Wang, H.; Pan, J.; Chen, C.; Chiu, C. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. *Process Biochemistry* **2010**, *45*, 1865–1872.
- (70) 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. *Journal of Food Engineering* **2007**, *80*, 997–1001.
- (71) Gelmez, N.; Kincal, N.; Yener, M. 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. *The Journal of Supercritical Fluids* **2009**, *48*, 217–224.
- (72) Rojas, D.; Narváez, C.; 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*; Colombia, 2008; pp. 49–60.

## ANEXOS

### Anexo A: Diagramas de metodología.

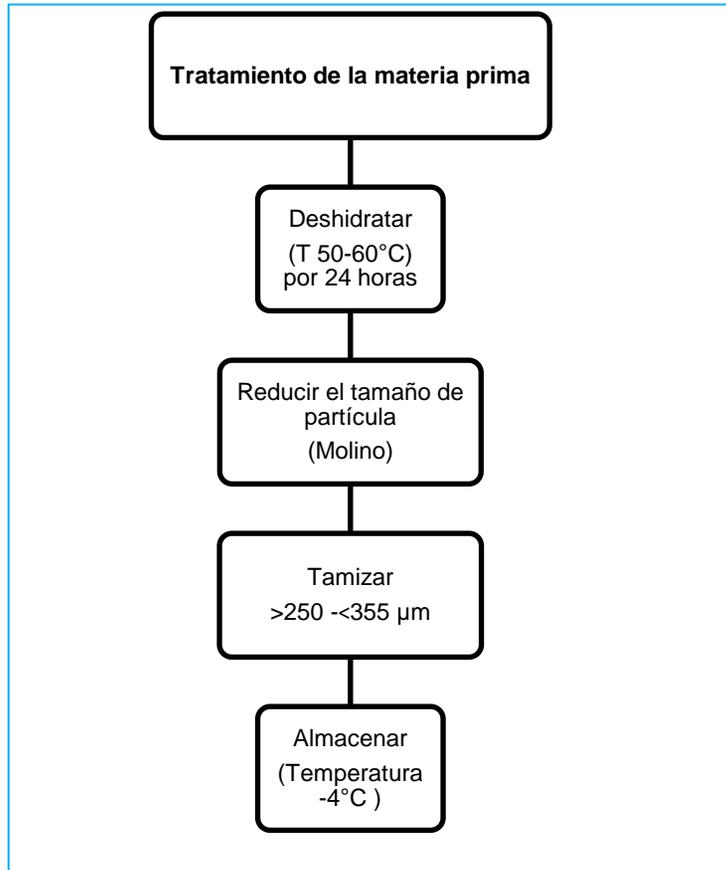


Figura 1.1. Tratamiento de la materia prima.

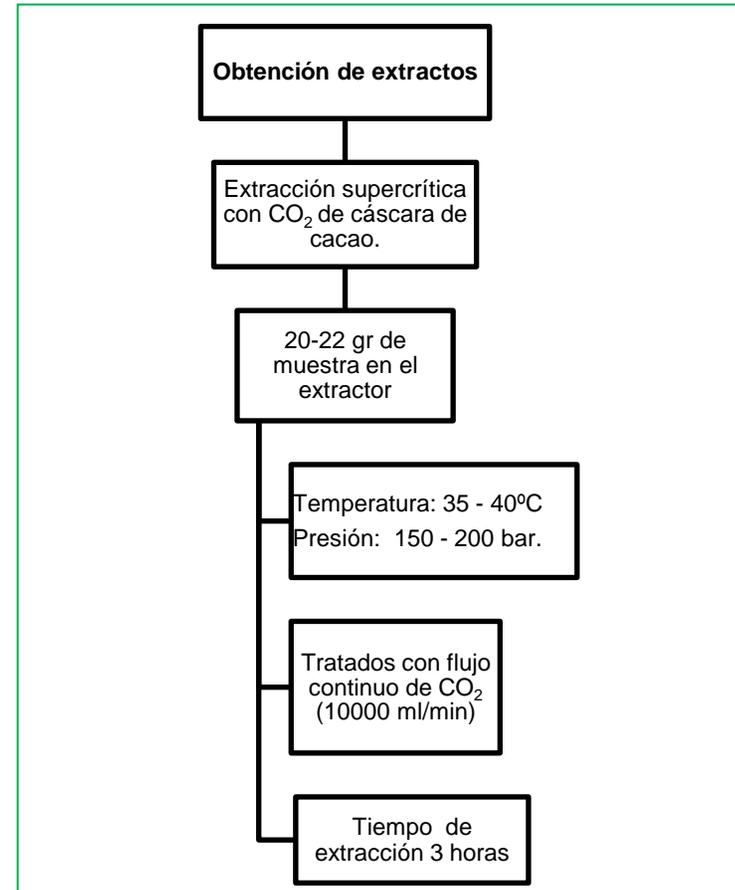


Figura 1.2. Obtención de los extractos (fracción lipofílica)

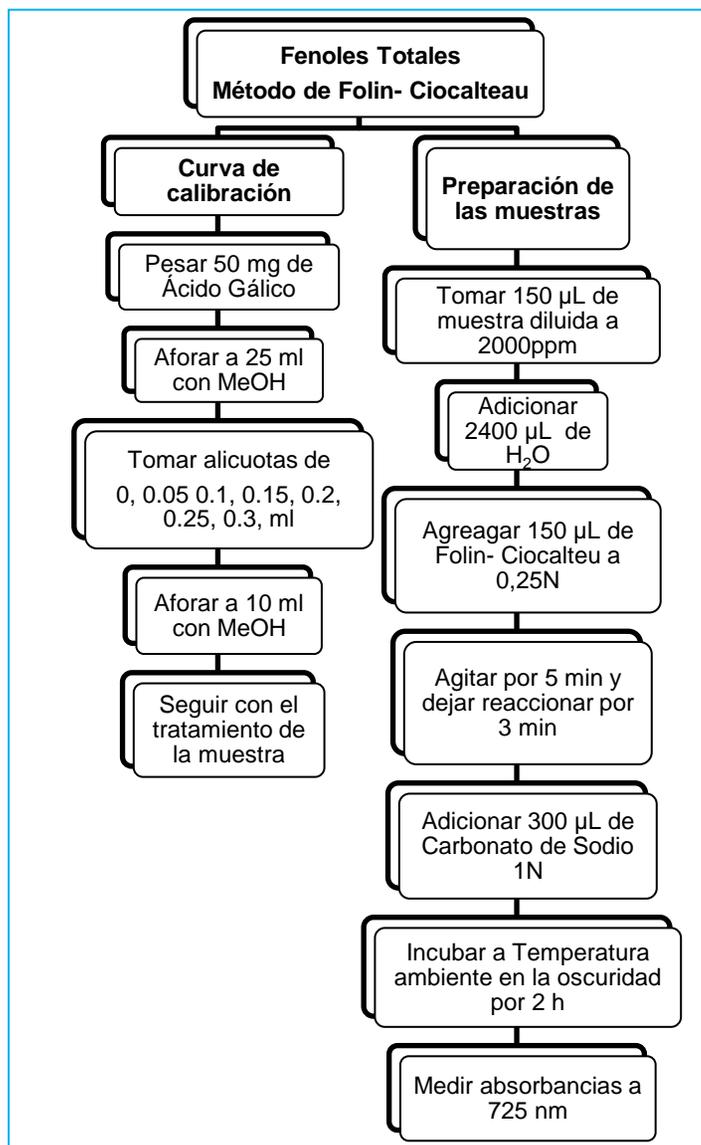


Figura 1.3. Determinación del contenido de fenoles totales.

- Preparación de la solución madre

$$C. \text{ solución} = \frac{\text{mg de AG} \times \text{Riqueza}}{\text{Aforo}}$$

$$C = \frac{50 \text{ mg} \times 99\%}{25 \text{ ml}} \times \frac{1000 \text{ ml}}{1 \text{ L}} = 1980 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$

Concentración de estándar

$$C = \frac{\text{Alícuota} \times C. \text{ solución}}{\text{Aforo}}$$

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	C. estándar mg/L
0	10	0.00
0.05	10	9.9
0.1	10	19.8
0.15	10	29.7
0.2	10	39.6
0.25	10	49.5
0.3	10	59.4

- Preparación de Folin 0.25 N

$$C_1.V_1 = C_2.V_2$$

$$(2 \text{ N}).(x) = (0.25 \text{ N}).(10 \text{ ml})$$

$$x = 1.25 \text{ ml de Folin aforados en } 10 \text{ ml de } H_2O$$

- Carbonato de Sodio 1 N

Peso Molecular del  $Na_2CO_3$ : 106 g/mol

$$N = \frac{P.M}{Eq} = \frac{106 \text{ g/mol}}{2} = 53 \text{ g}$$

$$\begin{array}{cc} 53 \text{ g} & 1000 \text{ ml} \\ x & 10 \text{ ml} \end{array}$$

$$x = 0.53 \text{ g de } Na_2CO_3 \text{ Aforados en } 10 \text{ ml de } H_2O$$

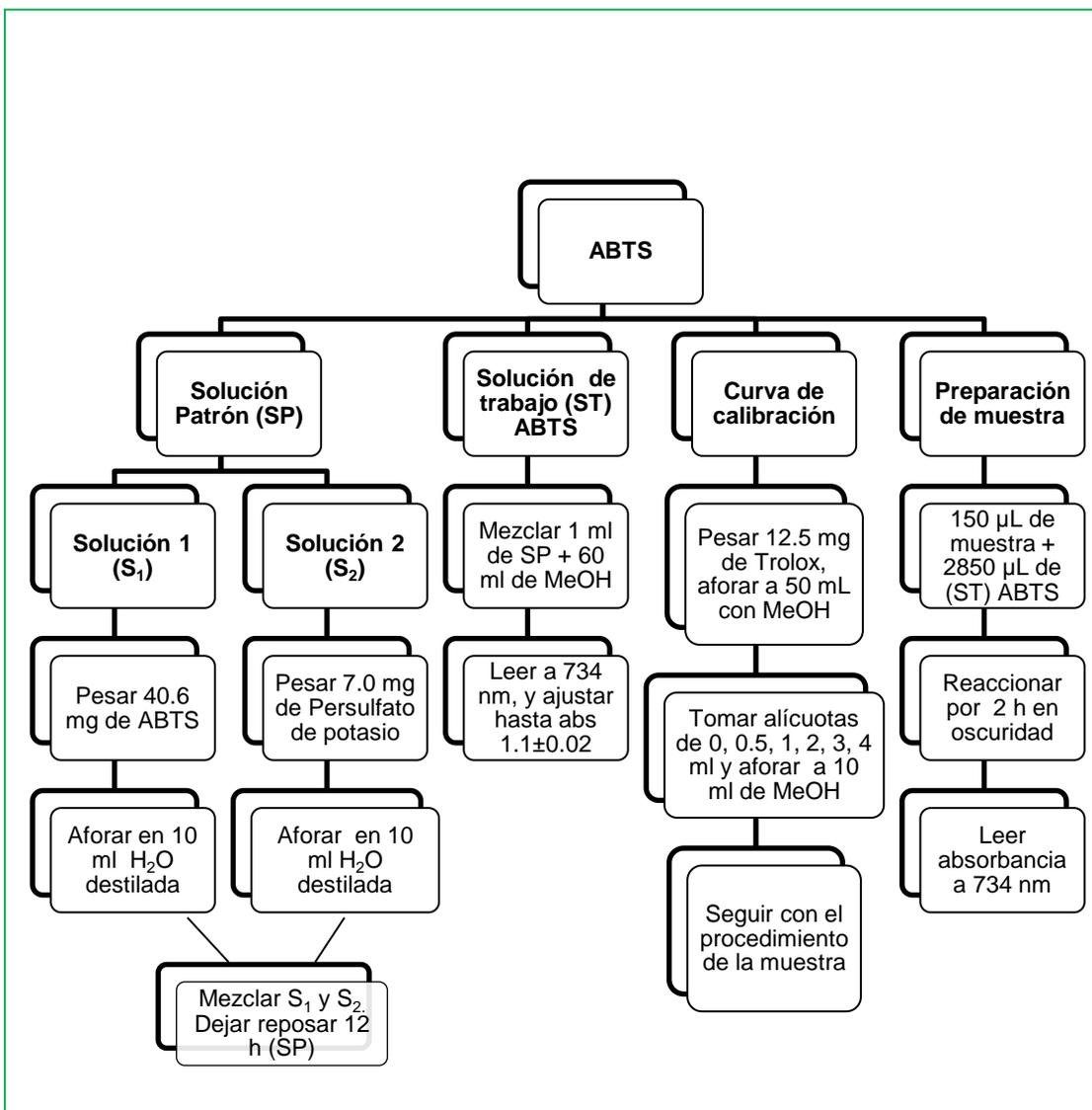


Figura 1.4. Diagrama del método ABTS.

- **Preparación de la solución madre Trólox**

P M del Trólox  $C_{14}H_{18}O_4$ : 250.29 g/mol

Riqueza: 97%

$$M = \frac{n}{V} = \frac{m}{PM \cdot V}$$

$$M = \frac{0.0125g}{250.29 g/mol} \cdot \frac{1}{50 ml} = 1 \times 10^{-6} mol/ml$$

$$\frac{1 \times 10^{-6} mol}{ml} \cdot \frac{1000ml}{1L} = 1 \times 10^{-3} M$$

$$1 \times 10^{-3} M \cdot \frac{1000mM}{1 M} \cdot \frac{1000 \mu M}{1mM}$$

$$M = 1000 \mu M$$

- **Concentración de estándar**

$$C = \frac{\text{Alícuota} \times C. \text{solución}}{\text{Aforo}}$$

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	Trólox (µM)
0	10	0.00
0.5	10	48.44
1	10	96.89
2	10	193.78
3	10	290.66
4	10	387.55

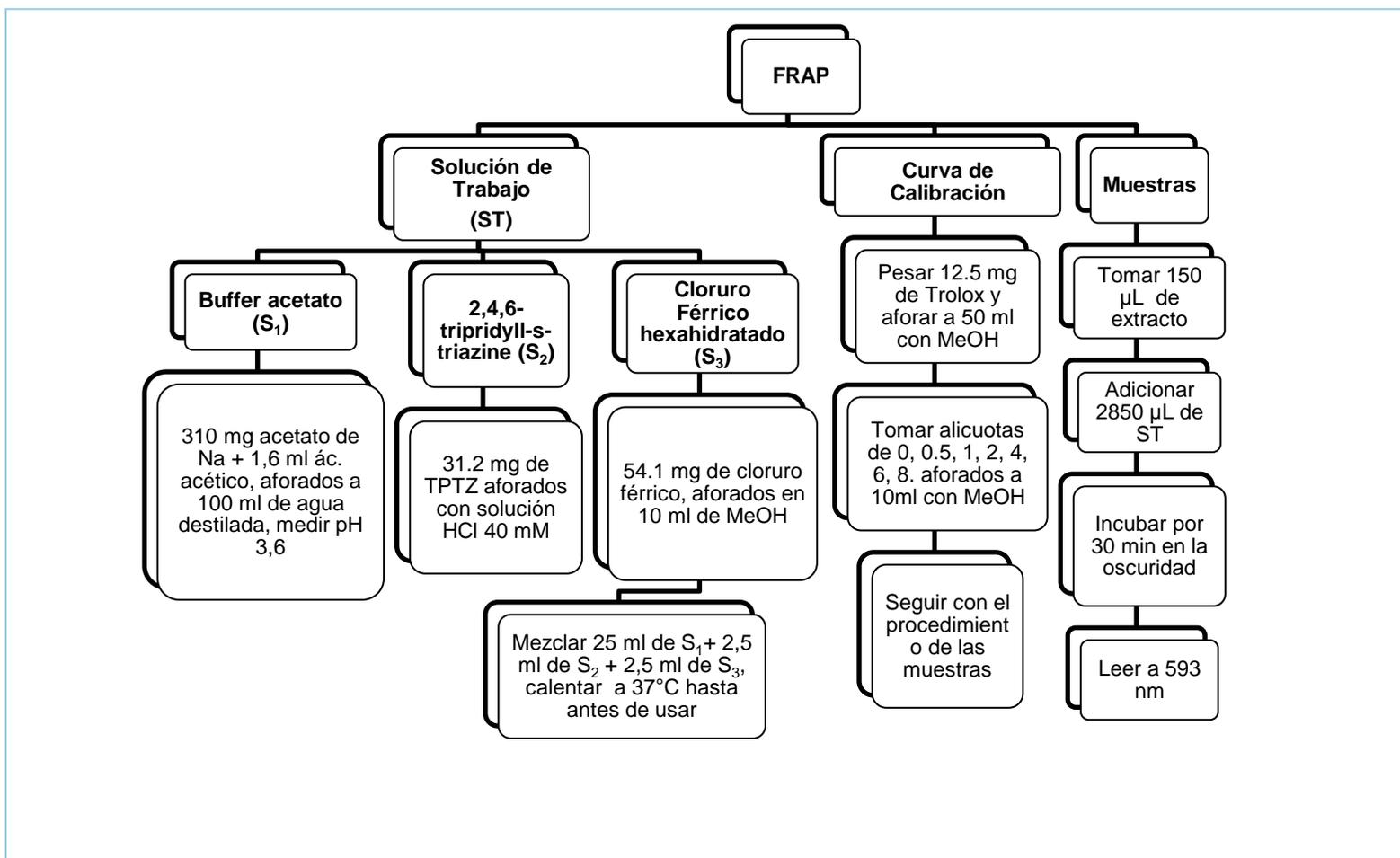


Figura 1.5. Diagrama del método FRAP.

- **Concentración de la solución madre Trólox**

P Molecular del Trólox  $C_{14}H_{18}O_4$  : 250.29 g/mol

Riqueza: 97%

$$M = \frac{n}{V} = \frac{m}{PM} \cdot \frac{1}{V}$$

$$M = \frac{0.0125g}{250.29 \frac{g}{mol}} \cdot \frac{1}{50 ml} = \frac{1 \times 10^{-6} mol}{ml} \cdot \frac{1000ml}{1L} =$$

$$1 \times 10^{-3} M \cdot \frac{1000mM}{1 M} \cdot \frac{1000 \mu M}{1mM} = M = 1000 \mu M$$

- **Preparación de soluciones**

- **S1 (Buffer acetato + Ác. acético)**

16 ml – 1000 ml

x – 100 ml

x = 1.6 ml de Ác. acético

3.1 g – 1000 ml

x – 100 ml

x = 0.31 g de Buffer acetato

- **S2 (TPTZ 10 mM + HCl 40mM)**

P.M del TPTZ: 312.33 g/mol

312.33 g/mol – 1M

x – 0.01M

3.1233 g – 1000 ml

x – 10ml

x = 0.0312 g Aforados con la solución HCl 40 mM

- **Solución HCl 40 mM**

P M HCl: 36.5 g/mol

Riqueza 37%

36.5 g/mol – 1M

x – 0.04M

1.46 g/mol – 1000ml

x – 10ml

x = 0.0146g

$$V = \frac{m}{\rho} = \frac{0.0146 g}{1.18 g/ml} = 0.012ml$$

0.012 ml – 37%

x – 100%

x = 0.033 ml Aforados en 10 ml de H<sub>2</sub>O

- **S3 (Cloruro Férrico 20 mM)**

P M del FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O: 270.3 g/mol

270.3 g/mol – 1M

x – 0.02M

x = 5.406g

5.406g – 1000ml

x – 10ml

x = 0.0541 g

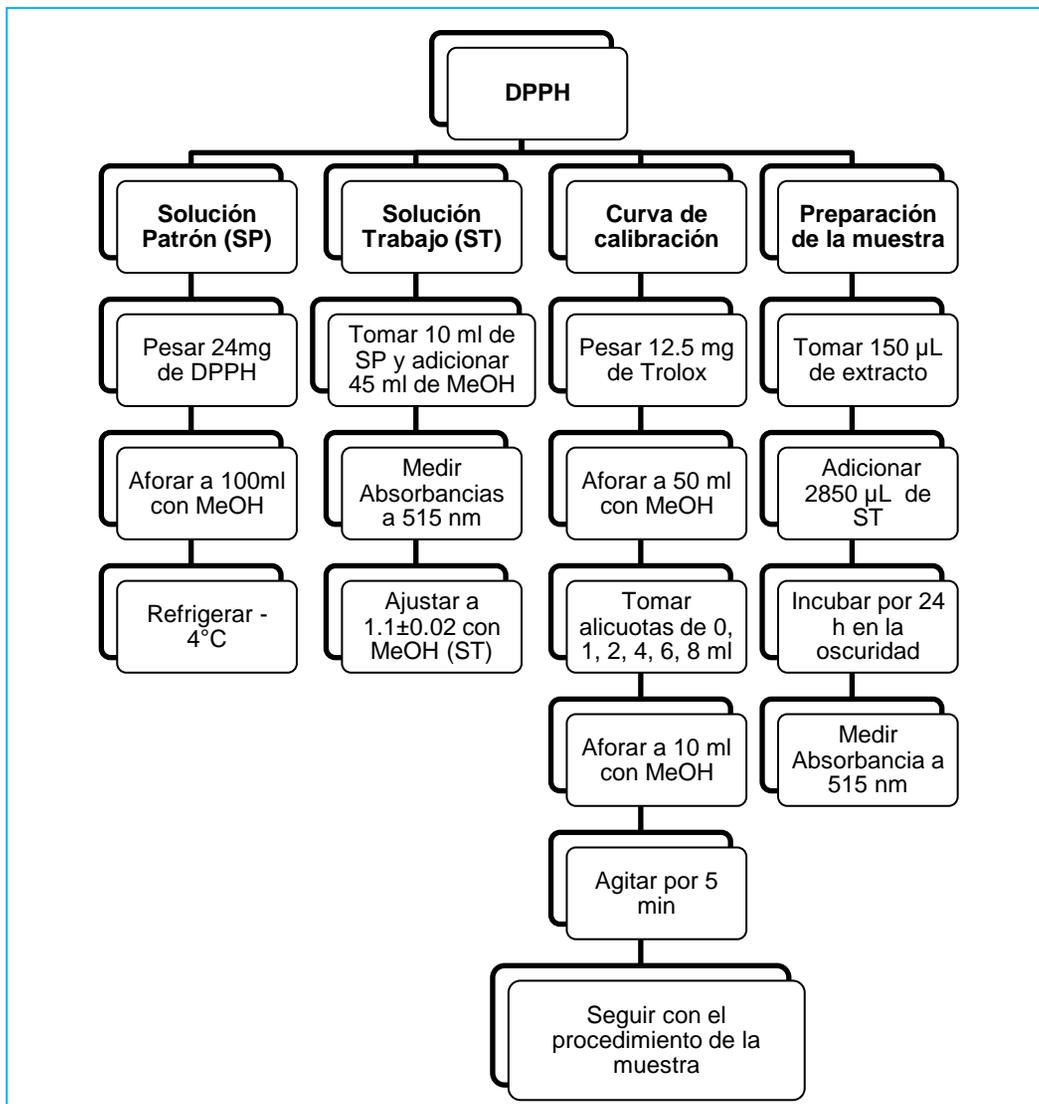


Figura 1.6. Diagrama del método DPPH.

- **Preparación de la solución madre Trólox**

P M del Trólox  $C_{14}H_{18}O_4$  : 250.29 g/mol

Riqueza: 97%

$$M = \frac{n}{V} = \frac{m}{PM} \cdot \frac{1}{V}$$

$$M = \frac{0.0125g}{250.29 \frac{g}{mol}} \cdot \frac{1}{50 ml} = \frac{1 \times 10^{-6} mol}{ml}$$

$$\frac{1 \times 10^{-6} mol}{ml} \cdot \frac{1000 ml}{1L} = 1 \times 10^{-3} M$$

$$1 \times 10^{-3} M \cdot \frac{1000 mM}{1 M} \cdot \frac{1000 \mu M}{1 mM}$$

$$M = 1000 \mu M$$

- **Concentración de estándar**

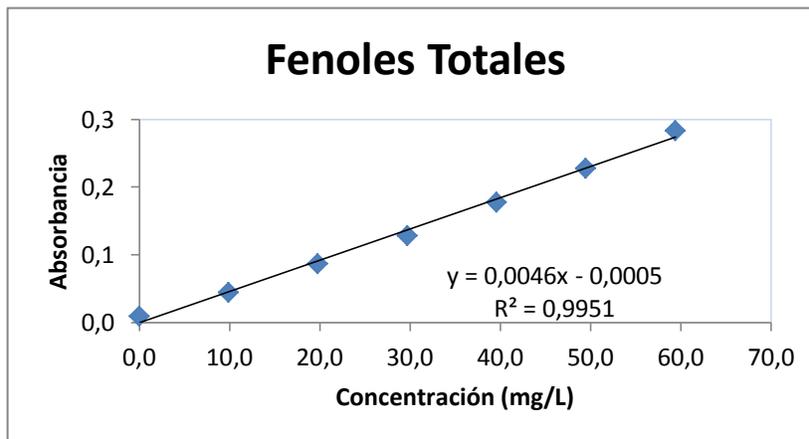
$$C = \frac{\text{Alícuota} \times C. \text{solución}}{\text{Aforo}}$$

Alícuota (ml)	Aforo (ml)	Trólox (µM)
0	10	0.00
1	10	96.89
2	10	193.78
4	10	387.55
6	10	581.33
8	10	775.10

## ANEXO B: Curvas de calibración.

**Tabla 1.1** Datos de curva de calibración para fenoles totales con lo que se evaluó los extractos obtenidos en FSC.

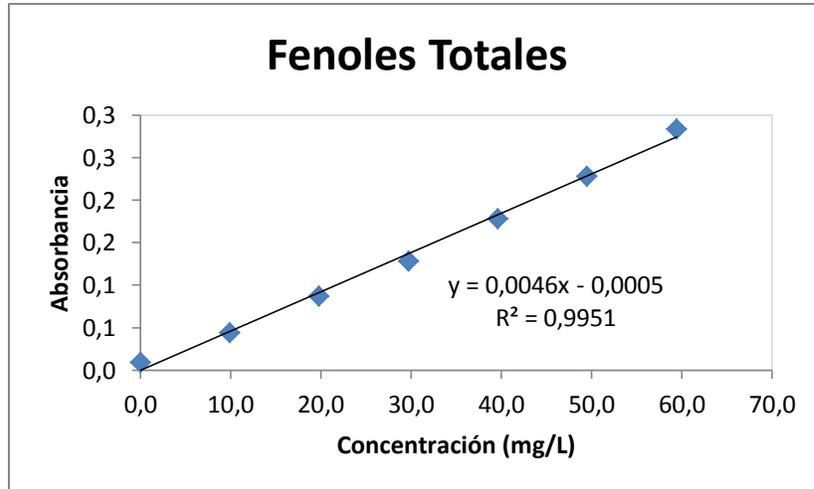
Alícuota	Volumen Aforo (ml)	Concentración AG (mg/L)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0.00	0.009	0.009	0.009	0.009
0,05	10	9.9	0.044	0.045	0.044	0.044
0,1	10	19.8	0.086	0.088	0.087	0.087
0,15	10	29.7	0.128	0.128	0.129	0.128
0,2	10	39.6	0.177	0.178	0.179	0.178
0,25	10	49.5	0.228	0.228	0.228	0.228
0,3	10	59.4	0.284	0.283	0.284	0.284



**Figura 1.7.** Curva de calibración fenoles totales.

**Tabla 1.2.** Datos de la curva de calibración de fenoles totales con los que se evaluó los extractos obtenidos en Soxhlet.

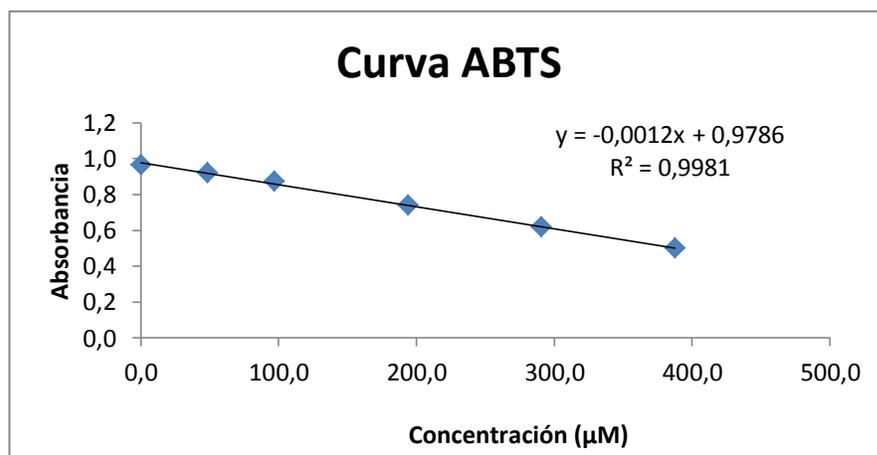
Alícuota (ml)	Volumen Aforo (ml)	Concentración AG (mg/L)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0.00	0.009	0.01	0.009	0.009
0.05	10	9.9	0.05	0.05	0.05	0.050
0.1	10	19.8	0.089	0.09	0.09	0.090
0.2	10	39.6	0.168	0.169	0.167	0.168
0.3	10	59.4	0.26	0.26	0.261	0.260
0.4	10	79.2	0.337	0.339	0.337	0.338
0.5	10	99	0.432	0.433	0.433	0.433



**Figura 1.8.** Curva de calibración fenoles totales.

**Tabla 1.3** Datos de curva de calibración para el método ABTS con los que se evaluó los extractos obtenidos en FSC.

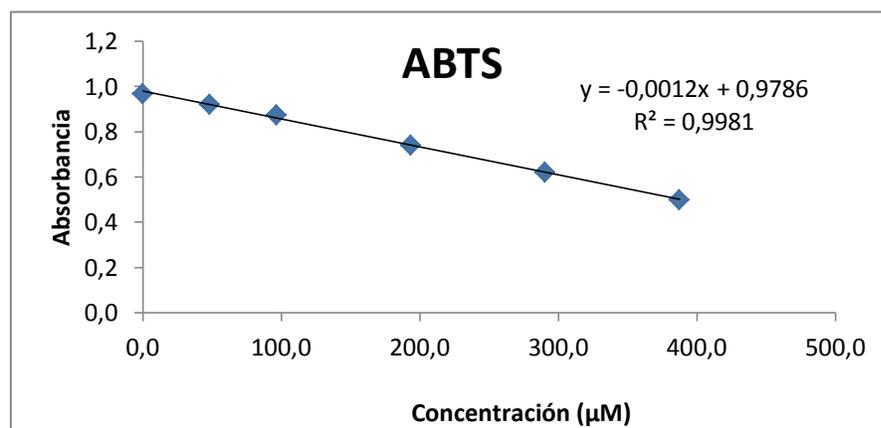
Alícuota (ml)	Volumen Aforo (ml)	Concentración Trólox ( $\mu\text{M}$ )	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0.00	0.967	0.969	0.966	0.967
0.5	10	48.44	0.920	0.921	0.922	0.921
1	10	96.89	0.873	0.874	0.873	0.873
2	10	193.78	0.739	0.741	0.740	0.740
3	10	290.66	0.620	0.619	0.621	0.620
4	10	387.55	0.501	0.501	0.499	0.500



**Figura 1.9.** Curva de calibración para el método ABTS

**Tabla 1.4** Datos de curva de calibración para el método ABTS con los que se evaluó los extractos obtenidos en Soxhlet.

Alícuota (ml)	Volumen Aforo (ml)	Concentración Trólox (µM)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0.00	0.945	0.944	0.944	0.944
0.5	10	48.44	0.885	0.880	0.882	0.882
1	10	96.89	0.851	0.855	0.852	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	0.190	0.195	0.193



**Figura 1.10.** Curva de calibración para el método ABTS

**Tabla 1.5** Datos de curva de calibración para el método FRAP con los que se evaluó los extractos obtenidos en FSC

Alícuota (ml)	Volumen Aforo (ml)	Concentración Trólox (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	0.716	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	1.933	1.933	1.933	1.933

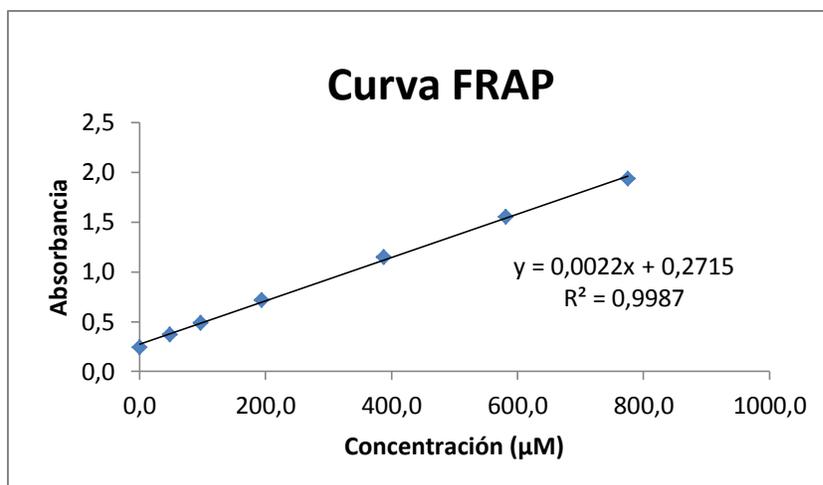


Figura 1.11. Curva de calibración para el método FRAP

Tabla 1.6 Datos de curva de calibración para el método FRAP con los que se evaluó los extractos obtenidos en Soxhlet.

Alícuota (ml)	Volumen Aforo (ml)	Concentración Trólox (µM)	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	19.78	0.595	0.595	0.596	0.595
4	10	387.55	0.995	0.994	0.990	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

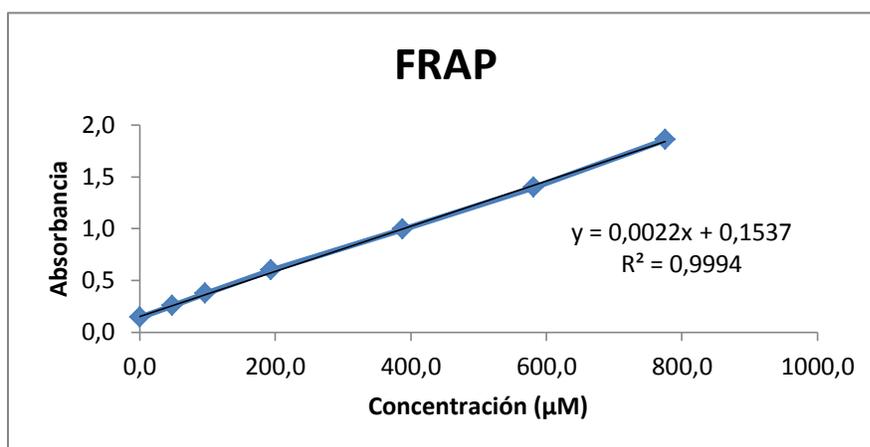
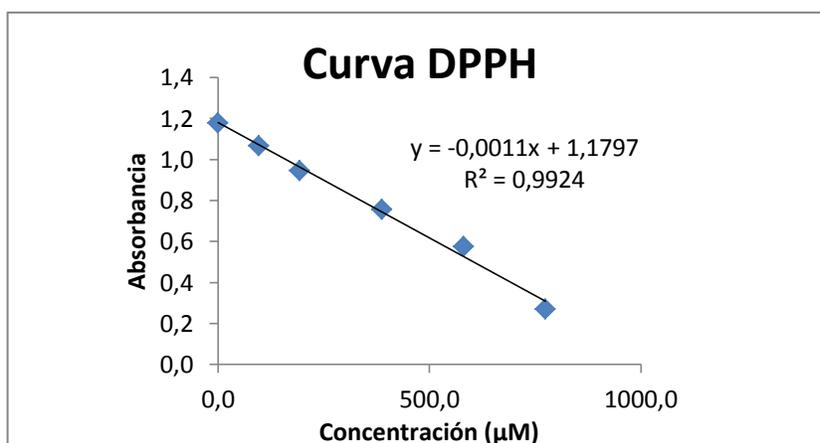


Figura 1.12. Curva de calibración para el método FRAP.

**Tabla 1.7** Datos de curva de calibración para el método DPPH con los que se evaluó los extractos obtenidos en FSC.

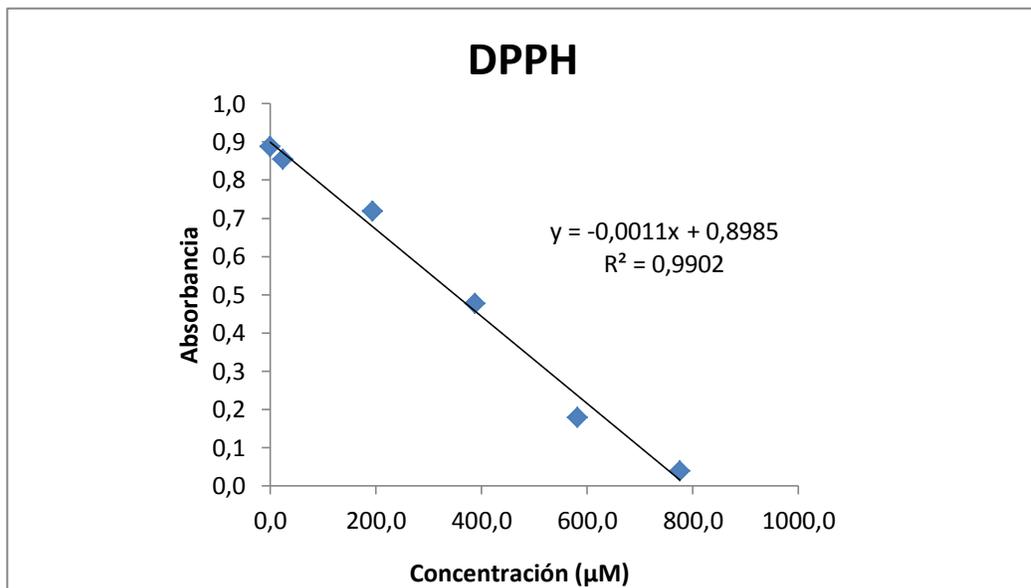
Alícuota (ml)	Volumen Aforo (ml)	Trólox (µM)	Absorbancia			
			Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio
0	10	0.00	1.179	1.179	1.176	1.178
1	10	96.89	1.066	1.066	1.067	1.066
2	10	193.78	0.944	0.944	0.946	0.945
4	10	387.55	0.759	0.757	0.757	0.758
6	10	581.33	0.575	0.575	0.576	0.575
8	10	775.10	0.271	0.271	0.272	0.271



**Figura 1.13.** Curva de calibración para el método DPPH

**Tabla 1.8** Datos de curva de calibración para el método FRAP con los que se evaluó los extractos obtenidos en Soxhlet.

Alícuota (ml)	Volumen Aforo (ml)	Concentración Trólox (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	0.854	0.856	0.855
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	0.040	0.037	0.040	0.039



**Figura 1.14.** Curva de calibración para el método DPPH

## ANEXO C: Resultados

**Tabla 1.8** Resultados de rendimientos de extracción utilizando FSC

Muestra	Condiciones		Muestra inicial Wi (g)	Extracto Wf (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento Promedio (%)	Desviación	%CV	
	Presión (bar)	Temperatura (°C)							
E35C-1	1	150	20.2636	0.05138	0.25	0.28	±	0.15	56.15
E35C-1	2	150	20.2000	0.02691	0.13				
E35C-1	3	150	20.1247	0.08865	0.44				
E35C-2	1	200	20.1596	0.07718	0.38	0.52	±	0.17	32.23
E35C-2	2	200	20.0448	0.14156	0.71				
E35C-2	3	200	20.0918	0.09429	0.47				
E40C-1	1	150	20.0830	0.11962	0.60	0.46	±	0.12	27.06
E40C-1	2	150	20.0663	0.07258	0.36				
E40C-1	3	150	20.0243	0.08221	0.41				
E40C-2	1	200	20.0110	0.07171	0.36	0.28	±	0.07	24.25
E40C-2	2	200	20.1889	0.04665	0.23				
E40C-2	3	200	20.4853	0.05180	0.25				

**Tabla 1.9** Resultados de rendimientos de extracción utilizando Soxhlet.

Repetición	Muestra inicial Wi (g)	Extracto Wf (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento Promedio (%)	Desviación	%CV
1	10.34198	0.04460	0.43	0.45	±	0.02
2	10.22153	0.04599	0.45			
3	10.29366	0.04880	0.47			

**Tabla 1.10** Resultados del contenido de fenoles totales en los extractos obtenidos por FSC.

Código		Absorbancia				Concentración (mg GAE/L)	Volumen (ml)	W extracto 2000 ppm	W Extracto obtenido (g)	Wi muestra (g)	Concentración mg GAE/100g de MS	mg GAE/100g de MS			%CV
		Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio										
E35C-1	1	0.078	0.082	0.083	0.081	17.71739	4.055	0.0081	0.05138	20.2636	2.24619	2.27	±	1.35	59.40
E35C-1	2	0.063	0.062	0.067	0.064	14.02174	4.135	0.0083	0.02691	20.2000	0.93397				
E35C-1	3	0.075	0.076	0.075	0.075	16.48551	4.175	0.0084	0.08865	20.1247	3.63096				
E35C-2	1	0.094	0.093	0.095	0.094	20.54348	4.095	0.0082	0.07718	20.1596	3.93248	5.74	±	2.28	39.71
E35C-2	2	0.108	0.107	0.108	0.108	23.51449	4.100	0.0082	0.14156	20.0448	8.30318				
E35C-2	3	0.098	0.099	0.095	0.097	21.26812	4.050	0.0081	0.09429	20.0918	4.99052				
E40C-1	1	0.065	0.071	0.07	0.069	15.03623	4.000	0.0080	0.11962	20.0830	4.47800	3.80	±	1.30	34.22
E40C-1	2	0.059	0.059	0.056	0.058	12.71739	4.050	0.0081	0.07258	20.0663	2.29995				
E40C-1	3	0.104	0.101	0.104	0.103	22.50000	4.050	0.0081	0.08221	20.0243	4.61870				
E40C-2	1	0.032	0.037	0.035	0.035	7.64493	4.000	0.0080	0.07171	20.0110	1.36981	1.47	±	0.10	6.55
E40C-2	2	0.058	0.058	0.058	0.058	12.71739	4.050	0.0081	0.04665	20.1889	1.46929				
E40C-2	3	0.056	0.056	0.057	0.056	12.35507	4.050	0.0081	0.05180	20.4853	1.56208				

**Tabla 1.11** Resultados del contenido de fenoles totales en los extractos obtenidos por Soxhlet.

Muestra	Absorbancia				Concentración (mg GAE/l)	Volumen de solución (ml)	W extracto 2000 ppm	W Extracto obtenido (g)	Wi muestra (g)	Concentración en mg GAE/100g de MS	mg GAE/100g de MS			%CV
	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio										
1	0.070	0.071	0.069	0.070	16.00000	4.053	0.0081	0.04460	10.34198	3.45002	3.61	±	0.19	5.14
2	0.070	0.069	0.069	0.069	15.83333	4.100	0.0082	0.04599	10.22153	3.56197				
3	0.071	0.069	0.071	0.070	16.08333	4.350	0.0087	0.04880	10.29366	3.81238				

**Tabla 1.12** Resultados del método ABTS en los extractos obtenidos por FSC.

Código		Absorbancia				Concentración $\mu\text{M}$	Volumen de solución (ml)	W extracto 2000 ppm (g)	W Extracto obtenido (g)	Wi muestra (g)	Concentración $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS	$\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS			%CV
		Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio										
E35C-1	1	0.825	0.826	0.825	0.825	152.6667	4.055	0.0081	0.05138	20.2636	0.19350	0.21	±	0.13	60.55
E35C-1	2	0.836	0.835	0.835	0.835	142.6667	4.135	0.0083	0.02691	20.2000	0.09503				
E35C-1	3	0.818	0.819	0.819	0.819	159.3333	4.175	0.0084	0.08865	20.1247	0.35093				
E35C-2	1	0.890	0.891	0.892	0.891	87.0000	4.095	0.0082	0.07718	20.1596	0.16654	0.25	±	0.09	34.73
E35C-2	2	0.883	0.883	0.883	0.883	95.0000	4.100	0.0082	0.14156	20.0448	0.33545				
E35C-2	3	0.880	0.878	0.878	0.879	99.3333	4.050	0.0081	0.09429	20.0918	0.23308				
E40C-1	1	0.855	0.855	0.855	0.855	123.0000	4.000	0.0080	0.11962	20.0830	0.36631	0.26	±	0.09	36.52
E40C-1	2	0.873	0.874	0.872	0.873	105.0000	4.050	0.0081	0.07258	20.0663	0.18989				
E40C-1	3	0.870	0.872	0.871	0.871	107.0000	4.050	0.0081	0.08221	20.0243	0.21964				
E40C-2	1	0.842	0.841	0.841	0.841	136.6667	4.000	0.0080	0.07171	20.0110	0.24488	0.19	±	0.05	24.99
E40C-2	2	0.841	0.843	0.841	0.842	136.3333	4.050	0.0081	0.04665	20.1889	0.15751				
E40C-2	3	0.845	0.844	0.845	0.845	133.3333	4.050	0.0081	0.05180	20.4853	0.16858				

**Tabla 1.13** Resultados del método ABTS en los extractos obtenidos por Soxhlet.

Muestra	Absorbancia				Concentración $\mu\text{M}$	Volumen de solución (ml)	W extracto 2000 ppm (g)	W Extracto obtenido (g)	Wi muestra (g)	Concentración $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS	$\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS			%CV
	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio										
1	0.898	0.899	0.899	0.899	49.3333	4.053	0.0081	0.04460	10.34198	0.10638	0.12	±	0.01	7.35
2	0.893	0.899	0.898	0.897	51.3333	4.100	0.0082	0.04599	10.22153	0.11548				
3	0.899	0.896	0.893	0.896	52.0000	4.350	0.0087	0.04880	10.29366	0.12326				

**Tabla 1.14** Resultados del método FRAP en los extractos obtenidos por FSC.

Código		Absorbancia				Concentración $\mu\text{M}$	Volumen de solución (ml)	W extracto 2000 ppm (g)	W Extracto obtenido (g)	Wi muestra (g)	Concentración $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS	$\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS			%CV
		Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio								±		
E35C-1	1	0.469	0.469	0.468	0.469	98.8333	4.055	0.0081	0.05138	20.2636	0.12530	0.14	±	0.07	54.59
E35C-1	2	0.479	0.479	0.478	0.479	103.8333	4.135	0.0083	0.02691	20.2000	0.06916				
E35C-1	3	0.468	0.469	0.469	0.469	98.8333	4.175	0.0084	0.08865	20.1247	0.21768				
E35C-2	1	0.406	0.405	0.406	0.406	67.3333	4.095	0.0082	0.07718	20.1596	0.12889	0.16	±	0.05	34.22
E35C-2	2	0.398	0.398	0.398	0.398	63.5000	4.100	0.0082	0.14156	20.0448	0.22422				
E35C-2	3	0.381	0.381	0.381	0.381	55.0000	4.050	0.0081	0.09429	20.0918	0.12906				
E40C-1	1	0.482	0.484	0.484	0.483	106.1667	4.000	0.0080	0.11962	20.0830	0.31618	0.23	±	0.07	30.56
E40C-1	2	0.470	0.470	0.470	0.470	99.5000	4.050	0.0081	0.07258	20.0663	0.17995				
E40C-1	3	0.474	0.475	0.474	0.474	101.6667	4.050	0.0081	0.08221	20.0243	0.20870				
E40C-2	1	0.430	0.432	0.430	0.431	79.8333	4.000	0.0080	0.07171	20.0110	0.14304	0.11	±	0.03	28.54
E40C-2	2	0.417	0.417	0.417	0.417	73.0000	4.050	0.0081	0.04665	20.1889	0.08434				
E40C-2	3	0.426	0.424	0.424	0.425	76.8333	4.050	0.0081	0.05180	20.4853	0.09714				

**Tabla 1.15** Resultados del método FRAP en los extractos obtenidos por Soxhlet.

Muestra	Absorbancia				Concentración $\mu\text{M}$	Volumen de solución (ml)	W extracto 2000 ppm (g)	W Extracto obtenido (g)	Wi muestra (g)	Concentración $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS	$\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS			%CV
	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio								±		
1	0.362	0.359	0.360	0.360	103.6667	4.053	0.0081	0.04460	10.34198	0.22353	0.21	±	0.01	5.90
2	0.331	0.330	0.332	0.331	89.0000	4.100	0.0082	0.04599	10.22153	0.20022				
3	0.339	0.339	0.339	0.339	93.0000	4.350	0.0087	0.04880	10.29366	0.22045				

**Tabla 1.16** Resultados del método DPPH en los extractos obtenidos por FSC.

Código	Absorbancia			Promedio	Concentración $\mu\text{M}$	Volumen de solución (ml)	W extracto 2000 ppm (g)	W Extracto obtenido (g)	Wi muestra (g)	Concentración $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS	$\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS			%CV	
	Señal 1	Señal 2	Señal 3												
E35C-1	1	0.870	0.874	0.874	0.873	306.3333	4.055	0.0081	0.05138	20.2636	0.38837	0.42	±	0.23	55.25
E35C-1	2	0.872	0.873	0.873	0.873	306.3333	4.135	0.0083	0.02691	20.2000	0.20405				
E35C-1	3	0.877	0.878	0.878	0.878	301.3333	4.175	0.0084	0.08865	20.1247	0.66369				
E35C-2	1	0.906	0.907	0.906	0.906	272.6667	4.095	0.0082	0.07718	20.1596	0.52195	0.71	±	0.23	32.53
E35C-2	2	0.905	0.905	0.905	0.905	274.0000	4.100	0.0082	0.14156	20.0448	0.96752				
E35C-2	3	0.907	0.906	0.906	0.906	272.6667	4.050	0.0081	0.09429	20.0918	0.63981				
E40C-1	1	0.911	0.911	0.909	0.910	268.6667	4.000	0.0080	0.11962	20.0830	0.80013	0.61	±	0.17	27.43
E40C-1	2	0.914	0.914	0.914	0.914	265.0000	4.050	0.0081	0.07258	20.0663	0.47925				
E40C-1	3	0.912	0.902	0.912	0.909	270.3333	4.050	0.0081	0.08221	20.0243	0.55493				
E40C-2	1	0.909	0.907	0.908	0.908	271.0000	4.000	0.0080	0.07171	20.0110	0.48557	0.37	±	0.10	26.64
E40C-2	2	0.919	0.918	0.917	0.918	261.0000	4.050	0.0081	0.04665	20.1889	0.30154				
E40C-2	3	0.918	0.919	0.918	0.918	260.6667	4.050	0.0081	0.05180	20.4853	0.32957				

**Tabla 1.71** Resultados del método DPPH en los extractos obtenidos por Soxhlet.

Muestra	Absorbancia				Concentración $\mu\text{M}$	Volumen de solución (ml)	W extracto 2000 ppm (g)	W Extracto obtenido (g)	Wi muestra (g)	Concentración $\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS	$\mu\text{M}$ de Trólox/g de MS			%CV
	Señal 1	Señal 2	Señal 3	Promedio										
1	0.743	0.741	0.743	0.742	155.6667	4.053	0.0081	0.04460	10.34198	0.33566	0.27	±	0.06	21.1
2	0.798	0.797	0.798	0.798	100.3333	4.100	0.0082	0.04599	10.22153	0.22572				
3	0.792	0.791	0.792	0.792	106.3333	4.350	0.0087	0.04880	10.29366	0.25205				

## ANEXO D: Resultados de análisis estadístico ANOVA

### D-1. RENDIMIENTO VS. VARIABLES

#### ANOVA unidireccional: Rendimiento vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variabes	3	0,1377	0,0459	2,55	0,128
Error	8	0,1437	0,0180		
Total	11	0,2814			

S = 0,1340    R-cuad. = 48,93%    R-cuad. (ajustado) = 29,77%

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

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
E35C-1	3	0,2758	0,1548	(-----*-----)
E35C-2	3	0,5195	0,1674	(-----*-----)
E40C-1	3	0,4560	0,1234	(-----*-----)
E40C-2	3	0,2808	0,0681	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
0,16      0,32      0,48      0,64

Desv.Est. agrupada = 0,1340

### D-2 FENOLES TOTALES VS. VARIABLES

#### ANOVA unidireccional: Fenoles Totales vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variabes	3	31,89	10,63	4,88	0,033
Error	8	17,44	2,18		
Total	11	49,33			

S = 1,476    R-cuad. = 64,65%    R-cuad. (ajustado) = 51,40%

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

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
E35C-1	3	2,270	1,349	(-----*-----)
E35C-2	3	5,742	2,280	(-----*-----)
E40C-1	3	3,799	1,300	(-----*-----)
E40C-2	3	1,467	0,096	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
0,0      2,5      5,0      7,5

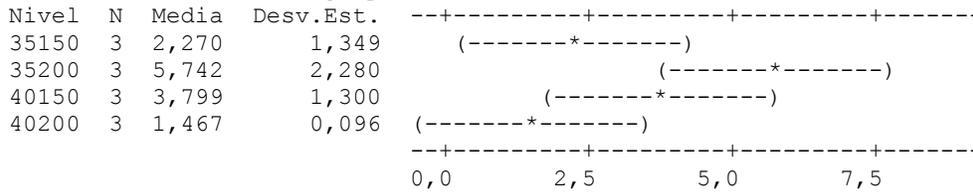
Desv.Est. agrupada = 1,476

#### ANOVA unidireccional: Prueba de Tukey para fenoles totales

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	3	31,89	10,63	4,88	0,033
Error	8	17,44	2,18		
Total	11	49,33			

S = 1,476    R-cuad. = 64,65%    R-cuad. (ajustado) = 51,40%

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



Desv.Est. agrupada = 1,476

Agrupar información utilizando el método de Tukey

	N	Media	Agrupación
35200	3	5,742	A
40150	3	3,799	A B
35150	3	2,270	A B
40200	3	1,467	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%  
 Todas las comparaciones en parejas

Nivel de confianza individual = 98,74%

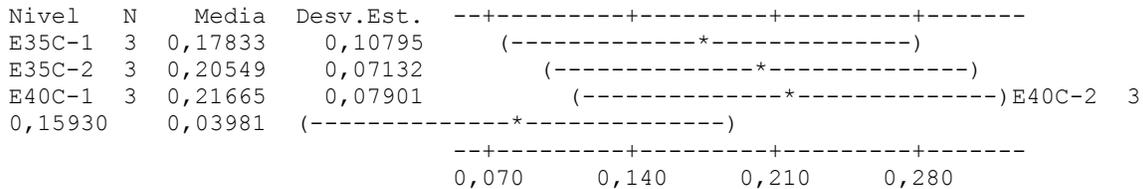
### D-3 ABTS VS. VARIABLES

#### ANOVA unidireccional: ABTS vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variables	3	0,00609	0,00203	0,33	0,804
Error	8	0,04914	0,00614		
Total	11	0,05522			

S = 0,07837    R-cuad. = 11,02%    R-cuad.(ajustado) = 0,00%

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



Desv.Est. agrupada = 0,07837

## D-4 FRAP VS. VARIABLES

### ANOVA unidireccional: FRAP vs. Variables

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Variables	3	0,02177	0,00726	2,39	0,144
Error	8	0,02426	0,00303		
Total	11	0,04603			

S = 0,05507 R-cuad. = 47,29% R-cuad. (ajustado) = 27,53%

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

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
E35C-1	3	0,12458	0,06800	(-----*-----)
E35C-2	3	0,14552	0,04981	(-----*-----)
E40C-1	3	0,21306	0,06514	(-----*-----)
E40C-2	3	0,09802	0,02799	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
0,070      0,140      0,210      0,280

Desv.Est. agrupada = 0,05507

## D-5 DPPH VS. VARIABLES

### ANOVA unidireccional: DPPH vs. Variables

#### ANOVA unidireccional: DPPH vs. Condiciones.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	3	0,2286	0,0762	2,11	0,178
Error	8	0,2896	0,0362		
Total	11	0,5182			

S = 0,1902 R-cuad. = 44,12% R-cuad. (ajustado) = 23,17%

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

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
35150	3	0,4187	0,2313	(-----*-----)
35200	3	0,7098	0,2309	(-----*-----)
40150	3	0,6114	0,1677	(-----*-----)
40200	3	0,3722	0,0992	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
0,25      0,50      0,75      1,00

Desv.Est. agrupada = 0,1902

## D-6. RENDIMIENTOS DE FSC vs. SOXHLET

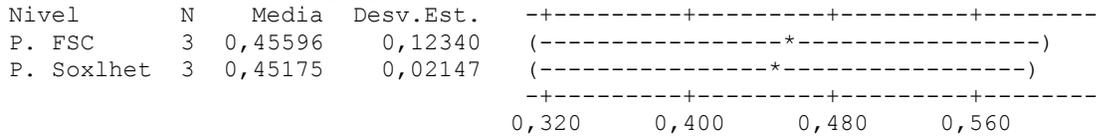
### ANOVA unidireccional: Rendimientos. FSC. vs. Soxhlet

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	0,00003	0,00003	0,00	0,956
Error	4	0,03138	0,00784		

Total 5 0,03140

S = 0,08857 R-cuad. = 0,08% R-cuad.(ajustado) = 0,00%

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



Desv.Est. agrupada = 0,08857

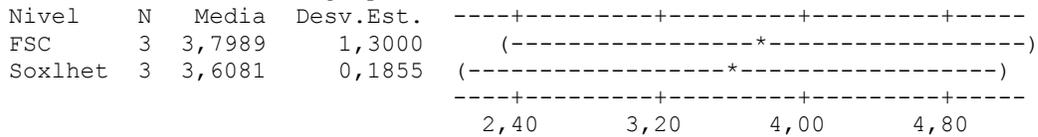
### D-7. FENOLES TOTALES DE FSC vs. SOXHLET

#### ANOVA unidireccional: Fenoles Totales FSC. vs Soxhlet

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	0,055	0,055	0,06	0,814
Error	4	3,449	0,862		
Total	5	3,504			

S = 0,9286 R-cuad. = 1,56% R-cuad.(ajustado) = 0,00%

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



Desv.Est. agrupada = 0,9286

Agrupar información utilizando el método de Fisher

### D-8. ABTS DE FSC vs. SOXHLET

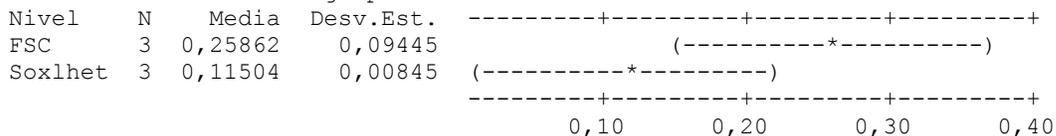
#### ANOVA unidireccional: ABTS. FSC. vs. Soxhlet

Desv.Est. agrupada = 0,06705

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	0,03092	0,03092	6,88	0,059
Error	4	0,01798	0,00450		
Total	5	0,04890			

S = 0,06705 R-cuad. = 63,23% R-cuad.(ajustado) = 54,04%

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



### D-9. FRAP DE FSC vs. SOXHLET

#### ANOVA unidireccional: FRAP. FSC. vs. Soxhlet

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	0,00061	0,00061	0,23	0,656
Error	4	0,01063	0,00266		
Total	5	0,01125			

S = 0,05156    R-cuad. = 5,45%    R-cuad.(ajustado) = 0,00%

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

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
FSC	3	0,23494	0,07181	(-----*-----)
Soxhlet	3	0,21473	0,01266	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
0,150      0,200      0,250      0,300

Desv.Est. agrupada = 0,05156

### D-10. DPPH DE FSC vs. SOXHLET

#### ANOVA unidireccional: DPPH. FSC. vs. Soxhlet

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	1	0,1737	0,1737	11,05	0,029
Error	4	0,0629	0,0157		
Total	5	0,2366			

S = 0,1254    R-cuad. = 73,43%    R-cuad.(ajustado) = 66,78%

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

Nivel	N	Media	Desv.Est.	
FSC	3	0,6114	0,1677	(-----*-----)
Soxhlet	3	0,2711	0,0574	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----  
0,20      0,40      0,60      0,80

Desv.Est. agrupada = 0,1254