

**EVALUACIÓN TÉCNICA Y ECONÓMICA DE LA EXTRACCIÓN DE
ANTIOXIDANTES A PARTIR DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DEL CACAO
(*Theobroma cacao* L.) UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**



**LUIS MIGUEL BUELVAS PUELLO
GABRIELA FRANCO ARNEDO**

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARTAGENA DE INDIAS, D.T. y C.**

2015

**EVALUACIÓN TÉCNICA Y ECONÓMICA DE LA EXTRACCIÓN DE
ANTIOXIDANTES A PARTIR DE LA CÁSCARA DE LA SEMILLA DEL CACAO
(*Theobroma cacao* L.) UTILIZANDO CO₂ SUPERCRÍTICO**

LUIS MIGUEL BUELVAS PUELLO

GABRIELA FRANCO ARNEDO

Trabajo de grado como requisito para optar al título de Ingeniero Químico

Director:

José Ángel Colina Márquez, Ph. D.

Co- Director:

Fabián Parada Alfonso, Ph. D.

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE INGENIERÍA
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARTAGENA DE INDIAS, D. T. y C.**

2015

Nota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Firma del jurado

Cartagena de Indias, 8 de Junio 2015.

DEDICATORIA

A Dios, por llenarme de paz, inteligencia y sabiduría necesaria.

A mi madre, Liliana Margarita Buelvas Puello, a mi madrina, tía y segunda madre, Lina Puello Gamarra, y a mi abuelo Álvaro Enrique Buelvas Coronel, mi eterna gratitud por toda la entrega, la confianza, el amor y el esfuerzo de todos estos años de vida. Espero seguir cosechando los frutos que en mi han sembrado.

Finalmente a la vida, por sus momentos de plenitud, inspiración y motivación.

Luis Miguel Buelvas Puello

DEDICATORIA

A Dios porque me ha permitido culminar esta etapa de mi proceso formativo. El desarrollo de este trabajo ha sido posible, en parte, a esas grandiosas casualidades, buena suerte y excelentes personas que uno se encuentra en el camino que para mí son resultado de la intervención de este gran ser.

Mis padres, mi apoyo y mi motor de vida. Gracias por su amor.

A Alicilla, a su amor incondicional de abuela, su alegría y su complicidad.

Gabriela Franco Arnedo

AGRADECIMIENTOS

A casa Luker por suministrarnos la cáscara de semilla de cacao.

A Team Foods por suministrar las muestras de aceite tipo mezcla sin antioxidantes.

Al profesor Fabián Parada, cuyo apoyo fue clave para realizar la etapa experimental de este trabajo, desarrollada en los laboratorios de investigación de Frutas Tropicales y Fluidos Presurizados del departamento de Química de la Universidad Nacional. Gracias por compartir con nosotros su experiencia y su alegría.

A la profesora Isabel Paz por ser la gestora de este proyecto y por su asesoría a lo largo del desarrollo del mismo. Es usted una gran profesora y persona de la cual hemos aprendido y admiramos mucho.

Al profesor José Colina por ser nuestro tutor, por su ayuda y asesoría incondicional para la culminación de este trabajo.

Al grupo de investigación de Estudio de los Cambios Químicos y Bioquímicos de Alimentos Frescos y Procesados de la Universidad Nacional de Colombia, a los profesores y compañeros por permitir realizar la pasantía de investigación en el grupo y hacer de esta una experiencia enriquecedora. A Mónica Ospina, por su amistad, su compañía y ayuda en el laboratorio.

A la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá por aceptarnos como pasantes de investigación y por permitirnos tener esta experiencia cultural y académica.

A la Universidad de Cartagena y al programa de Ingeniería Química, que ha contribuido tanto a nuestro crecimiento profesional y personal, les agradecemos por permitir desarrollar este proyecto.

A nuestros compañeros y hermanos Luis Tejeda, Malena Ramírez, Jorge Fragoso, Carlos Barrios, Dalma Marsiglia, María A. Ochoa, Daniel Pedroza, José Arzuaga, Hanier Fajardo y Miguel Ward por su compañía tan valiosa a lo largo de estos cinco años.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1. GENERAL	3
1.2. ESPECÍFICOS	3
2. ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN	4
3. HIPÓTESIS	6
4. MARCO DE REFERENCIA	7
4.1. MARCO TEÓRICO	7
4.1.1. La agroindustria	7
4.1.2. Producto agrícola: Cacao (<i>Theobroma cacao</i> L.)	7
4.1.3. Polifenoles	9
4.1.4. Antioxidantes	15
4.1.5. Técnicas convencionales de extracción	23
4.1.6. Fluidos supercríticos	24
4.1.7. Extracción con fluidos supercríticos (EFS)	26
4.2. ANTECEDENTES	27
4.2.1. Antioxidantes	27
4.2.2. Antioxidantes naturales	29
4.2.3. Compuestos fenólicos de origen natural usados como antioxidantes	29
4.2.4. Aprovechamiento del cacao y sus compuestos fenólicos	30
4.2.5. Extracción de antioxidantes asistidos con fluidos supercríticos	31
4.2.6. CO ₂ supercrítico como agente extractor de antioxidantes	31
4.3. ESTADO DEL ARTE	32
5. METODOLOGÍA	35
5.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN	35
5.2. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	35

5.3. VARIABLES	35
5.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	36
5.4.1. Muestra: Preparación de la muestra y caracterización	36
5.4.2. Extracción Soxhlet a presión reducida	38
5.4.3. Extracción con CO ₂ supercrítico	39
5.4.4. Determinación del Contenido Total de Fenoles (CTF)	45
5.4.5. Ensayo de Actividad Antioxidante (AA)	46
5.4.6. Metodología para la comparación de resultados	51
5.4.7. Metodología para análisis estadístico.....	51
5.4.8. Metodología para la evaluación Económica	52
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	56
6.1. Caracterización de la muestra: Análisis Proximal	56
6.2. Extracción Soxhlet a presión reducida.....	57
6.2.1. Rendimientos.....	57
6.2.2. Contenido Total de Fenoles.....	60
6.2.3. Actividad antioxidante por captación de radical DPPH.....	61
6.2.4. Correlación de TPC y AA en los extractos Soxhlet	63
6.3. Extracción con CO ₂ supercrítico	64
6.3.1. Diseño experimental n.º 1	64
6.3.2. Curva de extracción.....	65
6.3.3. Rendimientos.....	65
6.3.4. Contenido Total de Fenoles.....	67
6.3.5. Actividad antioxidante por captación de radical DPPH.....	68
6.4. Comparación de resultados entre extractos Soxhlet, supercríticos y datos encontrados en literatura científica.....	71
6.5. Análisis estadístico: diseño experimental n.º 2.....	73
6.5.1. Correlación entre CTF y la actividad antioxidante	74
6.5.2. Regresión no lineal para los resultados experimentales	75
6.5.3. Optimización del proceso de extracción supercrítica.....	80
6.6. Actividad antioxidante de los extractos más activos en aceite vegetal.....	81

6.7. Evaluación económica	84
CONCLUSIONES	87
RECOMENDACIONES	88
REFERENCIAS	89
ANEXOS	102
GLOSARIO	115

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Principales clases de compuestos polifenólicos. Adaptado de (Bravo, 1998).	11
Tabla 2. Clasificación de flavonoides presentes en alimentos. Tomado de (Bravo, 1998) .	12
Tabla 3. Antioxidantes primarios (según su origen) que son comúnmente usados en los alimentos.	18
Tabla 4. Compuestos que exhiben actividad antioxidante secundaria. Adaptado de (Wanasundara & Shahidi, 2005).	19
Tabla 5. Temperatura y presión crítica de sustancias usuales. Adaptado de (Valverde García, 1995).	25
Tabla 6. Operacionalización de las variables. Diseño experimental 2.	35
Tabla 7. Descripción del diseño experimental establecido	44
Tabla 8. Diluciones para realizar la curva de calibración con Ácido Gálico.	46
Tabla 9. Datos para realizar curva de calibración con Trolox.	47
Tabla 10. Comparación entre caracterización del cacao colombiano y caracterización de cacao español (Barcelona Patente nº ES2099676, 1997) y cacao italiano (Arlorio, y otros, 2005).	56
Tabla 11. Porcentajes de rendimiento y desviación estándar (DE) de la extracción soxhlet con análisis Tukey.	59
Tabla 12. Tabla de datos para el contenido total de fenoles de extractos soxhlet.	61
Tabla 13. Datos para la actividad antioxidante de los extractos Soxhlet.	63
Tabla 14. Rendimientos obtenidos por EFS (CO ₂ con EtOH).	66
Tabla 15. CTF de los extractos supercríticos.	68
Tabla 16. Actividad antioxidante de los extractos supercríticos.	70
Tabla 17. Comparación de contenido total de fenoles de cáscara de semilla de cacao colombiana y de otros orígenes, así como CTF de otras biomásas.	71
Tabla 18. Tabla comparativa de actividad antioxidante de cáscara de semilla de cacao colombiana extraída con CO ₂ supercrítico y soxhlet.	73
Tabla 19. Resumen estadísticos para resultados obtenidos para la extracción supercrítica. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	74

Tabla 20. Analisis de Varianza para resultados obtenidos para la extracción supercrítica. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	76
Tabla 21. Análisis de Varianza para Rendimiento Total. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	76
Tabla 22. Análisis de Varianza para Contenido Total de Polifenoles (CTF). Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	76
Tabla 23. Resultados estimados para regresión no lineal del modelo estadístico para Contenido Total de Polifenoles. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	78
Tabla 24 Análisis de Varianza para Modelo estadístico para la determinación de CTF en función de la presión y el cosolvente. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	79
Tabla 25. Resultados de Optimización de respuesta. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	81
Tabla 26. Cinética de producción de hidroperóxidos totales. Promedios con letras diferentes fueron significativamente al nivel de p-valor (prueba Tukey).	82
Tabla 27. Cinética de producción de especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico. Promedios con letras diferentes fueron significativamente al nivel de p-valor (prueba Tukey).	84
Tabla 28. Resumen Financiero. Tomado de los resultados arrojados por el <i>software</i> Aspen Hysys.	84
Tabla 29. Resumen de Inversión y Costos del Proceso. Tomado de los resultados arrojados por el <i>software</i> Aspen Hysys.	84
Tabla 30. Costos de las Corrientes del Proceso. Tomado de los resultados arrojados por el <i>software</i> Aspen Hysys.	85
Tabla 31. Costos de Equipos. Tomado de los resultados arrojados por el <i>software</i> Aspen Hysys.	86
Tabla 32. Métodos, pruebas y unidades para expresar resultados en la determinación de actividad antioxidante. Adaptado. (Wanasundara & Shahidi, 2005).	103

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representación y descripción del fruto Theobroma Cacao. Tomado de (Jiménez, 2014)	8
Figura 2. Apariencia de la cáscara de la semilla del cacao.	9
Figura 3. Núcleo estructural de los principales polifenoles. Se numeran los átomos de carbono del núcleo estructural de los flavonoides. Tomado de (Quiñones & otros, 2012).	10
Figura 4. Reacción de reducción del reactivo de Folin- Ciocalteu para la determinación del contenido total de fenoles.	14
Figura 5. Posibles interacciones de los antioxidantes primarios y secundarios en las rutas de oxidación de lípidos. Adaptado. (Wanasundara & Shahidi, 2005)	19
Figura 6. Efecto sinérgico de antioxidantes (a) 0,32% (p/p) Fosfatidiletanolamina (b) 0,02%(p/p), galato de propilo, y (c) es (a) + (b), evaluado en manteca de cerdo a 120°C, y el periodo de inducción fue usado para comparar la actividad antioxidante. Adaptado de (Wanasundara & Shahidi, 2005).	20
Figura 7. Oxidación de Ácido Linoleico. Formación de peróxido (compuesto intermedio), que luego pasa a hidroperóxido. Adaptado de (Bailey A. E., 1984)	22
Figura 8. Reacción del Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con el Malondialdehído (MDA). Adaptado de (Shahidi & Zhong, 2005).	23
Figura 9. Temperatura y presión crítica de sustancias usuales. Adaptado de (Valverde García, 1995)	26
Figura 10. Forma de obtención de los extractos soxhlet y condiciones de extracción.	39
Figura 11. Apariencia del extracto después de centrifugar y separar las dos fases, sobrenadante (a) y centrifugado (b).	40
Figura 12. Equipo para la extracción supercrítica.	40
Figura 13. Equipo de extracción supercrítica.	41
Figura 14. Detalle de la conexión de la bomba HPLC al extractor.	42
Figura 15. Diseño experimental 1. Temperatura (°C) - Presión (bar).	44
Figura 16. Diseño experimental 1. Cosolvente (%) - Presión (bar).	45

Figura 17. Montaje de burbujeo de aire del ensayo de oxidación de aceite.	49
Figura 18. Reacción del TEP con el HCl. Fuente: autores.....	51
Figura 19. Esquema de simulación del proceso de extracción de antioxidantes utilizando CO ₂ supercrítico.....	54
Figura 20. Esquema general de la metodología experimental.	55
Figura 21. Contenido de fenoles totales de extractos de cáscaras de semillas de cacao de diferentes orígenes. Tomado de (Bruna & otros, 2009).....	57
Figura 22. Rendimientos de extracción soxhlet de la fase solvente con análisis Tukey.....	58
Figura 23. Rendimientos de extracción soxhlet de la fase grasa con análisis Tukey.....	59
Figura 24. Rendimientos totales de la extracción soxhlet con análisis Tukey.....	59
Figura 25. CTF de los extractos soxhlet expresados en mg-eq de AG/g de extracto con análisis Tukey.....	60
Figura 26. CTF de los extractos soxhlet expresado en mg-eq de AG/g de cascarilla seca con análisis Tukey.....	61
Figura 27. Actividad antioxidante de extractos soxhlet expresada en porcentaje de inhibición de la oxidación con análisis Tukey.	62
Figura 28. Actividad antioxidante de extractos soxhlet expresada en μmol de Trolox/g extracto con análisis Tukey.	62
Figura 29. Actividad antioxidante de extractos soxhlet expresada en μmol de Trolox/g cascarilla seca con análisis Tukey.	63
Figura 30. Correlación entre CTF y CA. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	64
Figura 31. Curva para optimización del tiempo de extracción.	65
Figura 32. Rendimientos obtenidos para extracción con CO ₂ -EtOH.....	66
Figura 33. CTF de los extractos supercríticos expresado en mg-eq de AG/g de extracto. .	67
Figura 34. CTF de los extractos supercríticos expresado en mg-eq de AG/g de cascarilla seca.	68
Figura 35. Actividad antioxidante de los extractos supercríticos expresados en % de inhibición a la oxidación.	69

Figura 36. Actividad antioxidante de los extractos supercríticos expresados en μmol de Trolox/g extracto.	70
Figura 37. Actividad antioxidante de los extractos supercríticos expresados en μmol de Trolox/g cascarilla seca.	70
Figura 38. Correlación entre Contenido Total de Polifenoles (CTF) y Actividad Antioxidante. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	75
Figura 39. Diagrama de Pareto estandarizado de los resultados obtenidos del diseño experimental. La barra gris indica aumento o un incremento sobre la variable de respuesta. La barra azul indica efecto de disminución de la variable de respuesta. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	77
Figura 40. Efectos de las variables independientes sobre las variables de respuesta. Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	79
Figura 41. Superficie de respuesta estimada para Presión y Cosolvente vs Contenido Total de Polifenoles (CTF). Tomado de los datos arrojados por el <i>software</i> Statgraphics.	80
Figura 42. Cinética de oxidación de aceite a través de la cuantificación de hidroperóxidos totales.	82
Figura 43. Cinética de oxidación del aceite a través la cuantificación de especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.	83

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A: Métodos de ensayo de actividad antioxidante	103
Anexo B: Métodos de caracterización química	104
Anexo C: Métodos de análisis estadístico.....	106
Anexo D: Curvas de calibración para métodos analíticos.....	108
Anexo E: Especificación técnica y Condiciones de Operación de Equipos calculados por HYSYS.....	114

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue plantear el aprovechamiento de la cáscara de la semilla del cacao para la obtención de compuestos con actividad antioxidante utilizando CO₂ supercrítico y etanol como remplazo de antioxidantes sintéticos como terbutil-hidroquinona (TBHQ), ampliamente utilizado en la industria de alimentos, para lo cual se evaluó el efecto de la presión y el porcentaje de co-solvente sobre la actividad antioxidante. Con el fin de evaluar la viabilidad técnica, se comparó el método de extracción supercrítica con la extracción soxhlet a presión reducida utilizando solventes de diferente polaridad. Los extractos con mayor porcentaje de inhibición del radical 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) fueron: etanol previamente pasado por acetato de etilo (AcOEt-EtOH) (30.5%) y etanol (EtOH) (22.4%) para soxhlet y con CO₂-etanol los extractos 6 (250 bar, 20%) (18,8%) y 4 (270 bar, 15%) (14,8%). Se determinó como mejores condiciones de extracción 250,9 bar y 22% de etanol, por medio de un análisis de superficie de respuesta, maximizando los valores de contenido total de polifenoles y rendimiento, debido a la correlación entre actividad antioxidante y contenido total de fenoles que fue determinada del 99% para soxhlet y 91% para supercríticos. Adicionalmente, estos extractos, por ser los más activos, fueron probados como inhibidores de oxidación lipídica de un aceite vegetal comestible. El extracto con mayor protección a la oxidación lipídica fue AcOEt-EtOH por extracción soxhlet. La evaluación económica del proceso de extracción con las mejores condiciones de operación indicó que puede ser rentable para una planta de producción de antioxidantes con CO₂ supercrítico a escala piloto utilizando un extractor de 5 L que procesa 19 kg/día de biomasa. Los principales costos que impactaron fueron el uso de co-solvente y los compresores. Sin embargo se debe realizar un análisis más riguroso y un proceso de optimización de utilidades para obtener resultados más próximos a la realidad. Con lo anterior se determinó que la cáscara de la semilla de cacao es una biomasa promisoría para ser empleada como remplazo parcial del antioxidante sintético TBHQ, usado por la industria de aceites como antioxidante.

Palabras claves: CO₂ Supercrítico, Antioxidantes, *Theobroma cacao* L., Polifenoles, Evaluación económica, Extracción.

ABSTRACT

The aim of this research was to study the use of cocoa bean shell for the preparation of extracts containing compounds with antioxidant activity using supercritical CO₂ and ethanol as a replacement of the sintetical antioxidant tertiary butylhydroquinone (TBHQ) widely used in the food industry. Cocoa antioxidant activity was evaluated according with the effect of the pressure and the percentage of co-solvent. Supercritical extraction method was compared with soxhlet extraction under reduced pressure using solvents with different polarities to assess the technical feasibility of the extraction. The extracts with the highest percentage of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity were the ethanol extract obtained with a biomass that was previously extracted with ethylacetate (AcOEt-EtOH) (30.5%) and ethanol (EtOH) extract (22.4%) for soxhlet, and for CO₂ and ethanol, extract 6 (250 bar and 20%) (18.8%) and 4 (270 bar and 15%) (14.8%). The best extraction conditions were determined at 250.9 bar and 22% ethanol, using a response surface analysis, maximizing the values of total polyphenol content and total yield, because it was found a correlation between antioxidant activity and total phenol content for soxhlet (99%) and for supercritical extraction (91%). Additionally, the most active extracts were tested as inhibitors of lipid oxidation of an edible vegetable oil. The extract that showed greater protection to lipid oxidation was obtained by soxhlet extraction using AcOEt-EtOH. The economic evaluation of the extraction process with the best operating conditions indicated that an antioxidants pilot plant with supercritical CO₂ using a 5 L extraction vessel as the method of extraction can be profitable. The main costs that impacted were the use of co-solvent and compressors. However, it should conduct a more thorough analysis and process optimization utilities for obtaining more accurate results, related to a real situation. With the data obtained, it was determined that the cocoa bean shell is a promising biomass to be used as a partial replacement of the synthetic antioxidant TBHQ, used by the oil industry as an antioxidant.

Keywords: Supercritical CO₂, Antioxidants, *Theobroma cacao* L., Polyphenols, Economic Evaluation, Extraction.

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo propone aprovechar la cáscara de la semilla del cacao, residuo agroindustrial que representa un problema para las industrias debido al gran volumen generado y el poco valor económico que posee. Solo en el 2013 se estima que en Colombia se produjeron 9960,75 tm de este residuo, teniendo en cuenta que constituye un 12,5% de la semilla y que la producción del fruto ha tenido un crecimiento significativo desde 2010, (Casa Luker, 2015; Barcelona Patente nº ES2099676, 1997) y se prevé que la generación de estos residuos irá en aumento, debido al incentivo a la producción del fruto, contemplado en el Plan Nacional de Desarrollo Cacaotero (2012-2021) (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, 2012), por lo que se pretende encontrar un proceso que permita obtener un producto de mayor valor agregado (Abarca & otros, 2010; Fedecacao, 2009), por medio de la obtención de extractos ricos en antioxidantes, principalmente compuestos fenólicos, a partir de este residuo.

Para esto, se propone realizar un método de extracción no convencional, utilizando como disolvente CO₂ supercrítico y etanol, con el fin de obtener un extracto de alta pureza sin residuos de disolventes orgánicos tóxicos para los seres humanos. El CO₂ posee ventajas significativas: puede recircularse durante el proceso, es económico, inerte con muchas sustancias, fácil de eliminar y no es inflamable (Irianda & Benedito, 2007), mientras que el etanol, de acuerdo a la FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) es un disolvente GRAS (*Generally Recognised As Safe*) (Code of Federal Regulations. Food And Drug Administration, 2014), propiedades que hacen al proceso susceptible de aplicarse en la obtención de extractos para posibles aditivos en la industria alimenticia.

Anteriormente se han realizado estudios de actividad antibacteriana de cáscara de semilla de cacao colombiana (Cuéllar & Guerrero, 2012) y se han hecho extracciones con CO₂ supercrítico únicamente, midiendo actividad biológica y actividad antioxidante con cáscara de semilla de cacao italiana (Arlorio, y otros, 2005). Sin embargo, no se ha encontrado un estudio como el propuesto, que caracterice la cáscara de la semilla del cacao colombiana, pruebe su capacidad de inhibición oxidativa en un producto alimenticio y que realice una

evaluación económica que permita conocer la rentabilidad del proceso, por lo que realizar este trabajo de investigación será un primer aporte al posible desarrollo de agroindustrias que apliquen procesos de extracción no convencionales para obtener sustancias con mayor valor agregado y al aprovechamiento de residuos agroindustriales, que actualmente está tomando auge en el país.

La etapa experimental de esta investigación fue desarrollada con el apoyo del grupo de investigación Estudio de los Cambios Químicos y Bioquímicos de Alimentos Frescos y Procesados de la Universidad Nacional de Colombia en las instalaciones del departamento de Química de dicha universidad. Inicialmente, se realizó un análisis proximal a la muestra recibida de la empresa Casa Luker, midiendo su contenido de humedad, grasa, fibra, proteína, y cenizas. Luego se realizó una extracción soxhlet con disolventes de distinta polaridad con el fin de comparar este método convencional con las extracciones supercríticas. A estos extractos les fue medido contenido de polifenoles y actividad antioxidante con el fin de conocer qué tipo de disolvente es el mejor para utilizarse como co-solvente en la extracción con CO₂ supercrítico. Luego se realizó un diseño experimental para la selección de las mejores condiciones de extracción supercrítica, variando la presión y el porcentaje de co-solvente, sujeto a los límites del equipo y a valores encontrados en la literatura. A estos extractos, de igual manera, les fue medido contenido total de polifenoles y actividad antioxidante, escogiendo de esta manera, con base al extracto más activo y por medio de un análisis de superficie de respuesta, el mejor punto experimental de extracción. Seguido a esto, los extractos más activos, tanto en soxhlet como en extracción supercrítica, se les realizó un ensayo de actividad antioxidante en aceite vegetal comestible, tomando como muestra patrón el aceite con TBHQ (antioxidante sintético) y una muestra control. Finalmente, basados en los rendimientos y en el mejor punto experimental, se realizó una evaluación económica de un proceso de este tipo a escala piloto, a través del uso de un *software* comercial, obteniendo como variable de respuesta el retorno de la inversión en años, costos de capital inicial y costos de operación.

1. OBJETIVOS

1.1. GENERAL

Evaluar la viabilidad técnica y económica de la extracción de antioxidantes a partir del extracto de la cáscara de la semilla del cacao (*Theobroma cacao* L) obtenido con CO₂ supercrítico para su posible aplicación en la industria.

1.2. ESPECÍFICOS

- Caracterizar la cáscara residual de la semilla de cacao por medio de métodos analíticos para la determinación del contenido total de fenoles (antioxidantes) antes del proceso de extracción.
- Evaluar experimentalmente el efecto de la temperatura y la presión sobre la cantidad de antioxidante obtenido a partir del proceso de extracción con CO₂ supercrítico para la selección de las mejores condiciones de operación.
- Determinar la capacidad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos obtenidos a través de ensayos analíticos para la valoración de su aplicabilidad en la industria.
- Estimar la viabilidad económica del proceso de extracción de antioxidantes a partir de la cascarilla del cacao utilizando CO₂ supercrítico, haciendo uso de un *software* comercial para su posible aplicación en una planta a escala piloto.

2. ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN

En este trabajo, se identificó el potencial de la cáscara de la semilla del cacao para convertirse en un producto de alto valor agregado de forma competitiva, como lo son los extractos con poder antioxidante, esto mediante un estudio de la viabilidad técnica que incluye la caracterización de la materia prima, determinación del contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante, rendimiento y mejores condiciones de extracción, para lo cual se encontró que esta biomasa es promisorio como reemplazo parcial de los antioxidantes sintéticos utilizados en alimentos y puede resultar rentable a largo plazo para la industria. Este estudio se realizó en el período de un año en la Universidad de Cartagena, con realización de pruebas experimentales en la Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá durante cuatro meses. Posteriormente se realizó un estudio de viabilidad económica del proceso de extracción mediante una relación beneficio/costo.

La investigación estuvo delimitada a la toma de muestras de cascarilla de cacao proveniente de una agroindustria cacaotera (casa Luker), la cual recibe semillas de distintas partes de Colombia. La selección de las mejores condiciones de operación se realizó mediante un diseño experimental factorial compuesto 2^2 con cuatro puntos centrales y cuatro puntos estrella, tomando como variables a evaluar la presión en la vasija de extracción y el porcentaje de co-solvente, las cuales se encuentran limitadas por las condiciones soportadas por el equipo a emplear y las empleadas comúnmente en literatura, que aseguran los mejores rendimientos. Se considerarán como parámetros intervinientes el tiempo de batch o lote, el cual fue optimizado de acuerdo a una curva de extracción; tamaño de partícula y temperatura (Sunarso & Ismadji, 2009). Esta última aunque es una variable importante se toma constante con base a recomendaciones en la literatura consultada (Asep & otros, 2013; Teng-ju & otros, 2008; Salajegheh & otros, 2013). Con respecto a los resultados de las pruebas se espera obtener un extracto con buena actividad antioxidante y precio competitivos en el mercado, siendo promisorio para aplicar en la industria.

Adicionalmente se realizó una evaluación económica, simulando una planta piloto, permitiendo hacer un estimativo de la viabilidad económica utilizando ingeniería conceptual, al contemplar los costos de operación y costos fijos.

3. HIPÓTESIS

De la cáscara de la semilla de cacao colombiano se obtiene un extracto cuya actividad antioxidante es comparable con antioxidantes comerciales utilizando como método de extracción CO₂ supercrítico y etanol como co-solvente.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1. MARCO TEÓRICO

4.1.1. La agroindustria

Es una actividad económica que combina el proceso productivo agrícola con el industrial para generar alimentos o materias primas semi-elaboradas destinadas al mercado. También se dice que constituye una parte del sector industrial que se dedica a producir y/o transformar, almacenar y comercializar productos provenientes del campo.

A partir del marco de referencia anterior, se puede entonces decir que los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social (Saval, 2012).

4.1.2. Producto agrícola: Cacao (*Theobroma cacao* L.)

Es una baya grande comúnmente denominada "mazorca", carnosa, oblonga a ovada, amarilla o purpúrea, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, puntiaguda y con camellones longitudinales; cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas dispuestas en placentación axial e incrustadas en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa (Figura 1). Proviene del árbol del cacao, árbol de pequeña talla, perennifolio, de 4 a 7 m de altura (cultivado) (Figura 1). El cacao silvestre puede crecer hasta 20 m o más.

En el mundo se reconocen tres tipos de cacao, con base en la diversidad morfológica observada en Centro y Sudamérica: *T. cacao* ssp. **Cacao (Criollo)**, *T. cacao* ssp. **Sphaerocarpum (Forastero)** y **Trinitario** (cruce entre los dos primeros). El cacao Criollo es el de mayor calidad por su fino sabor y aroma, aunque el Forastero de sabor amargo es el más cultivado y comercializado por su tolerancia a enfermedades (ICA, 2012).



Figura 1. Representación y descripción del fruto *Theobroma Cacao*. Tomado de (Jiménez, 2014)

4.1.2.1. Origen / extensión

El origen de esta especie se remonta a más 3000 años atrás posiblemente en la región amazónica, (cuenca alta del río Amazonas). Actualmente esta región comprende países como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil. Sin embargo, Ghana obtiene el cacao desde 1879 y desde 1951 el oeste de África es el responsable del 60 % de la producción mundial. El género *Theobroma* se encuentra en estado natural en los pisos inferiores de las selvas húmedas de América tropical y prospera mejor entre los 18° N y 15° S del Ecuador a una altitud inferior a 1,250 m (CONABIO, 2014).

4.1.2.2. Hábitat

Crece en topografía plana u ondulada. Llega a crecer en terrenos que sobrepasan el 50 % de pendiente, en cañadas o a orilla de arroyos. Exige temperaturas medias anuales elevadas con fluctuaciones pequeñas, una gran humedad y una cubierta que le proteja de la insolación directa y de la evaporación. La precipitación debe ser de 1,300 a 2,800 mm por año con una estación seca corta, menor de 2 meses y medio. El clima debe ser constantemente húmedo, con temperatura media diaria entre 20 y 30 °C, con una mínima de 16 °C. Para su pleno desarrollo exige suelos profundos (1 m como mínimo), fértiles y bien drenados. Deben evitarse suelos arcillosos, arenosos, mal drenados o muy superficiales con presencia de rocas y un nivel freático poco profundo (CONABIO, 2014).

4.1.2.3. La cáscara de la semilla del cacao

La cáscara de la semilla del cacao (ver Figura 2) es un residuo proveniente de la agroindustria chocolatera. Es reconocida por su alto contenido en fibra y constituye un 12,5% en peso de la semilla (Barcelona Patente nº ES2099676, 1997). Este residuo es generado, generalmente, durante la etapa de tostado (World Cocoa Foundation, 2014), donde el calor provoca el desprendimiento de esta cáscara, que es posteriormente retirada en el proceso de trillado. Otra forma de retirarla es con un pre-tratamiento con choque de calor por aire caliente, vapor o infra-rojo como fuente de calor (Wollgast & Anklam, 2000).

Entre los usos que se le han dado se encuentran: Preparación de alimentos (Cuéllar & Guerrero, 2012; Soto Pereira, 2012), como biomasa para la obtención de electricidad (Fedecacao, 2009), producción de pectina (Suárez Rozo & Orozco Giraldo, 2014), precursor de producción de carbón activado (Ahmad & otros, 2012; Universita Alicante, 2014), extracción de compuestos plastificantes, antioxidantes y rellenos de refuerzo (Batteggazzore & otros, 2014), alimento animal, acondicionador de suelo (International Cocoa Organization, 2003) entre otros.



Figura 2. Apariencia de la cáscara de la semilla del cacao.

4.1.3. Polifenoles

4.1.3.1. Definición

Los compuestos polifenólicos son antioxidantes que constituyen una clase de metabolitos secundarios biosintetizados por el reino vegetal (Wood & otros, 2002); algunos son indispensables para sus funciones fisiológicas y pueden participar en funciones de defensa

ante situaciones de estrés y otros estímulos. Estos compuestos presentan una estructura molecular caracterizada por la presencia de uno o varios anillos fenólicos (Quiñones & otros, 2012).

Los polifenoles han sido ampliamente estudiados debido a sus efectos benéficos en los organismos vivos. Se ha reportado que estos compuestos poseen efectos anti-carcinogénicos, anti-aterogénicos, anti-ulcéricos, anti-trombóticos, anti-alérgicos, anti-inflamatorios, anti-microbianos, vasodilatadores y analgésicos, ejerciendo estos efectos como antioxidantes, quelantes de cationes divalentes, inhibidores de la actividad de enzimas, etc (Wollgast & Anklam, 2000).

4.1.3.2. Clasificación

Los polifenoles (ver ejemplos de estructuras de algunos tipos de polifenoles en la Figura 3 pueden ser divididos en 10 diferentes clases, de acuerdo a su estructura. En la Tabla 1 se muestra la estructura química básica de las principales clases de polifenoles. Los flavonoides, que constituyen el grupo más importante, tiene más de 500 compuestos identificados (Wollgast & Anklam, 2000). En la Tabla 2 se resume la clasificación de los flavonoides más importantes.

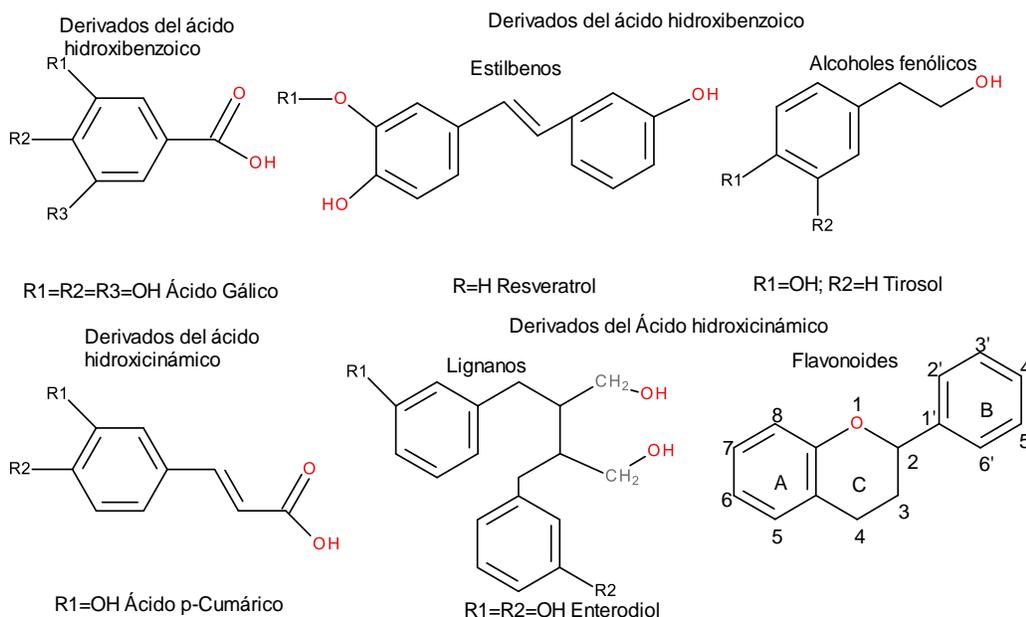
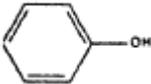
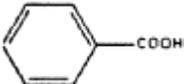
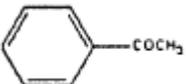
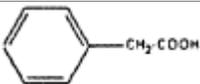
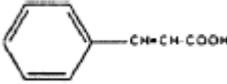
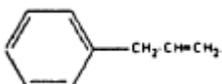
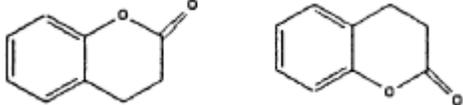
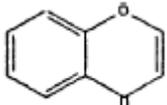
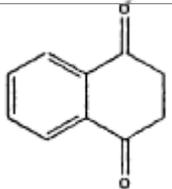
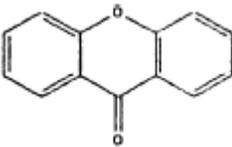


Figura 3. Núcleo estructural de los principales polifenoles. Se numeran los átomos de carbono del núcleo estructural de los flavonoides. Tomado de (Quiñones & otros, 2012).

Tabla 1. Principales clases de compuestos polifenólicos. Adaptado de (Bravo, 1998).

Clase	Esqueleto básico	Estructura básica	Ejemplos
Fenoles simples	C ₆		Fenol, resorcinol, cresol, timol, orcinol
Benzoquinonas	C ₆		
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁		Ácido gálico, vanílico
Acetofenonas	C ₆ -C ₂		Formas de esteres metílicos y etílicos
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂		
Ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃		Ác. Hidroxicinámicos (p-cumárico, cafeico, ferúlico)
Fenilpropenos	C ₆ -C ₃		
Cumarinas, isocumarinas	C ₆ -C ₃		
Cromonas	C ₆ -C ₃		
Naftoquinonas	C ₆ -C ₄		
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆		

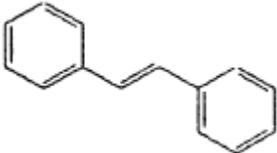
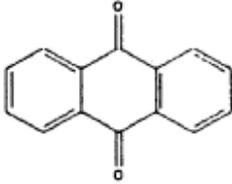
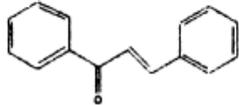
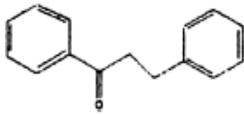
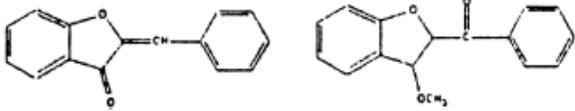
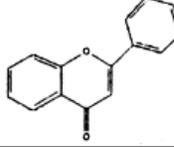
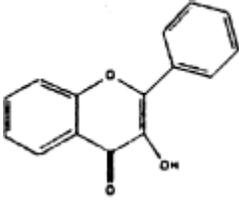
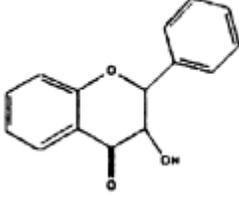
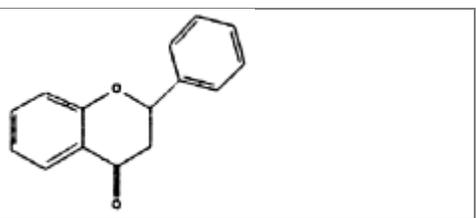
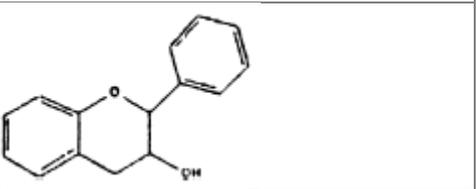
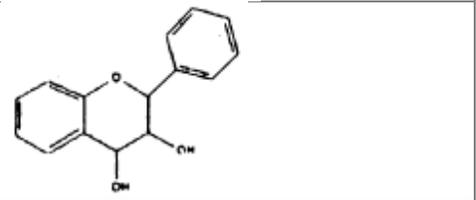
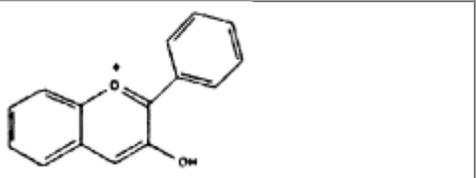
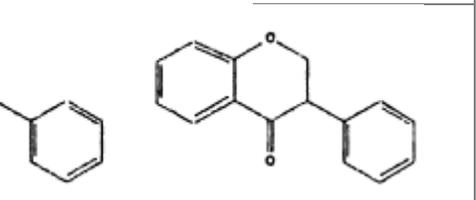
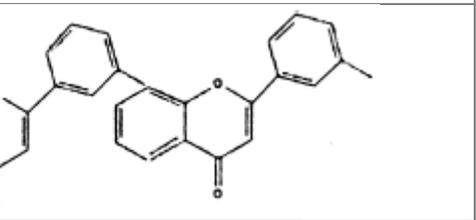
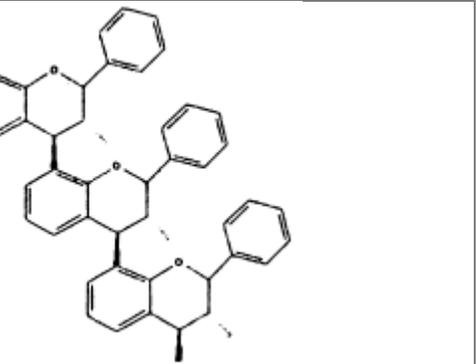
Estilbenos	$C_6-C_2-C_6$	
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoides	$C_6-C_3-C_6$	
Lignan, neolignan	$(C_6-C_3)_2$	
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$	

Tabla 2. Clasificación de flavonoides presentes en alimentos. Tomado de (Bravo, 1998)

Flavonoide	Estructura básica
Chalconas	
Dihidrochalconas	
Auronas	
Flavonas	
Flavonoles	
Dihydroflavonoles	

Flavanonas	
Flavanoles	
Flavandiol o leucoantocianidina	
Antocianidina	
Isoflavonoides	
Biflavonoides	
Proantocianidinas o taninos condensados	

Los flavonoides como la catequina, epicatequina y galocatequina son los constituyentes monoméricos de los taninos condensados, compuestos de intermedio a alto peso molecular, aunque también son muy comunes en forma de monómeros libres. Las antocianinas son el grupo más importante de pigmentos vegetales responsables del color de las flores y frutas de ciertas plantas. Los fenoles simples y flavonoides representan la mayoría de compuestos fenólicos presentes en las plantas (Bravo, 1998).

4.1.3.3. Determinación del contenido total de fenoles (CTF)

El método más comúnmente utilizado para cuantificar los compuestos polifenólicos en distintas matrices es el de Folin-Ciocalteu (F-C). Este reactivo es una mezcla de complejos de ácido fosfomolibdénico y ácido fosfotungsténico. El ensayo se basa en la transferencia de electrones en medio alcalino desde los compuestos fenólicos (u otros agentes reductores) hacia el molibdeno, formando un complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico azul (ver Figura 4) que puede ser detectado espectrofotométricamente entre 760-765 nm, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. El método no es específico para fenoles, puesto que puede ser reducido por otros compuestos como aminas aromáticas, hidroxilamina, azúcares, guanidina, tioles, muchas vitaminas, la base nucleótido de guanina, ácido ascórbico o Fe (II), por tanto mide la capacidad total de reducción de una muestra, no únicamente compuestos fenólicos (Correa Soto & Gaviria Mendoza, 2010; Gutierrez Avella & otros, 2008; Prior & otros, 2005)

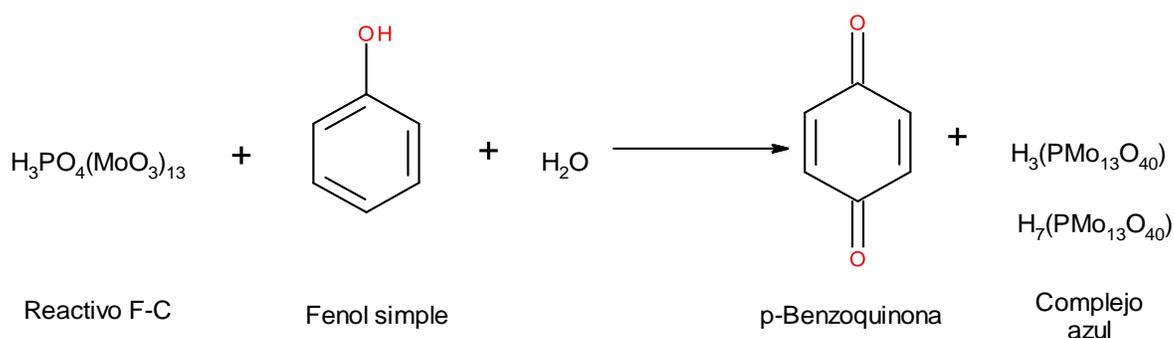


Figura 4. Reacción de reducción del reactivo de Folin- Ciocalteu para la determinación del contenido total de fenoles.

4.1.4. Antioxidantes

4.1.4.1. Definición y aplicaciones

En un sistema biológico, un antioxidante puede ser definido como cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones (en comparación con la de un sustrato oxidable) puede retrasar significativamente o evitar la oxidación de dicho sustrato (Wanasundara & Shahidi, 2005). Dicho sustrato oxidable puede ser cualquier molécula que se encuentra en los alimentos o materiales biológicos, incluyendo hidratos de carbono, ADN, lípidos y proteínas. Sin embargo, organismos reguladores como la FDA, lo definen como aquellos que se utilizan para conservar los alimentos con el fin de retardar el deterioro, la rancidez o decoloración debido a la oxidación (Code of Federal Regulations. Food and Drug Administration, 2014).

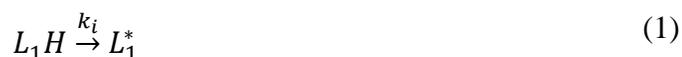
El uso de antioxidantes reduce el desperdicio de materia prima y la pérdida de la capacidad nutritiva que puede aportar dicho alimento, ya que lo preserva; además amplía la gama de grasas que se pueden utilizar en productos específicos. Por lo tanto, los antioxidantes son aditivos útiles que permiten a los procesadores de alimentos utilizar económicamente grasas y aceites en la formulación del producto. (Wanasundara & Shahidi, 2005).

4.1.4.2. Oxidación y su mecanismo en los lípidos

La oxidación de lípidos es influenciada por muchos factores externos: el medio, concentración de oxígeno, temperatura, luz, grado de insaturación de iones metales, entre otros. Los antioxidantes más ampliamente utilizados son eliminadores de radicales libres; aquellos que eliminan radicales reactivos formados en las etapas de iniciación y propagación de la **auto-oxidación** (Schaich, 2005). A continuación se detallan las etapas de oxidación de los lípidos:

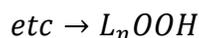
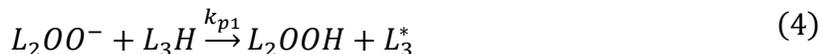
- **Iniciación (formación del radical de lípido libre)**

Se genera un radical lípido (Ecuación 1) o sustrato debido a factores externos (Schaich, 2005).



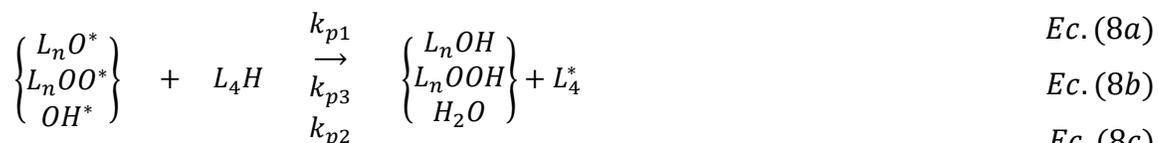
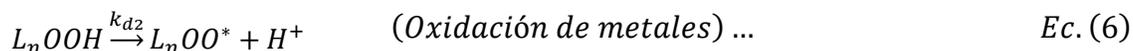
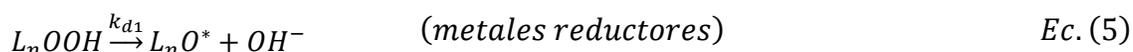
- **Propagación**

Reacción en cadena de los radicales libres (inicio de nuevas cadenas) (Schaich, 2005):



El radical de lípido es altamente reactivo con oxígeno atmosférico, esto resulta de la naturaleza di-radical de la molécula de oxígeno y esto produce un radical peróxido (Ec. 2). El radical peróxido reacciona con otra molécula de lípido insaturado, lo cual forma un hidroperóxido y un nuevo radical lípido inestable (Ec.3). Así como un nuevo radical es generado en cada paso, más oxígeno es incorporado en el sistema. Nuevamente el radical lípido reaccionará con oxígeno para producir otro radical peróxido, el resultado es un proceso de autocatálisis cíclico (Ec. 4).

La formación de los hidroperóxidos puede ser realizado por tres caminos: por metales reductores, oxidación de metales y energía termica o rayos uv (Ec. 5,6,7) ¹.



Ec. (8b)

Ec. (8c)



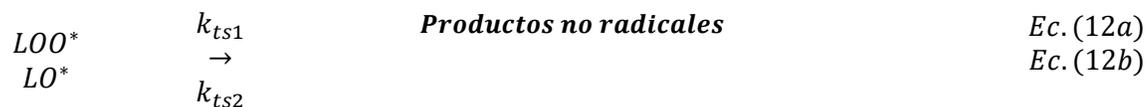
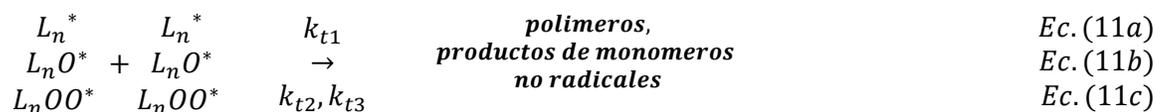
¹i – iniciación; o – oxigenación; β – O₂ escisión; p – propagación; d – disociación; t – terminación; ts – terminación/iniciación



La ecuación 7 describe la formación de hidroperóxidos por la fotooxidación de un lípido con un sensibilizador ($h\nu$ es la energía en forma de luz UV). Éstos están naturalmente presentes en los pigmentos fotosensibles, sub-productos de degradación o hidrocarburos aromáticos poli-cíclicos y son capaces de transferir energía de la luz a las moléculas químicas. La oxidación térmica también es autocatalítica y es también conocida como oxidación catalizada por metales y se puede producir como se propone en las Ecuaciones 8a, 8b y 8c. Los metales redox de valencia variable también pueden catalizar la descomposición de hidroperóxidos (Ec. 5 y 6) (Schaich, 2005).

- **Terminación (formación de productos no radicales)**

Solamente se puede llevar a cabo la terminación cuando dos radicales libres se encuentren y formen un compuesto no reaccionante (Ec. 11a, b y c). Toda esta degradación produce compuestos con indeseados olores, sabores, rancidez debido a la oxidación:



Hay que mencionar que las reacciones generalizadas del esquema clásico de reacción en cadena de radicales libres son muy simplificadas y, debido a que no retratan la amplia gama de reacciones secundarias competitivas que contribuyen a las grandes complejidades de la oxidación de lípidos, son a menudo incompatibles con una cinética de oxidación de los productos de mezcla (Schaich, 2005).

Los procesos de oxidación de lípidos en los alimentos o tejidos biológicos pueden ser más complicados, pero todavía siguen mecanismos fundamentales identificados en las reacciones químicas más simples (Schaich, 2005).

4.1.4.3. Clasificación de antioxidantes

De acuerdo a su mecanismo de acción para terminar con la oxidación podemos clasificarlos en: de ruptura primaria o de cadena y secundarios o preventivos. De acuerdo con esta clasificación, algunos antioxidantes exhiben más de un mecanismo para su actividad química, por lo tanto, se hace referencia como antioxidantes de múltiples funciones.

- **Los antioxidantes primarios o de cadena.**

Los antioxidantes primarios también se conocen como tipo 1 o los antioxidantes de ruptura de cadena. Debido a la naturaleza química de estas moléculas, que pueden actuar como aceptores de radicales libres, pueden retrasar o inhibir la etapa de iniciación o interrumpir el paso de propagación de la autooxidación. Éstos no pueden inhibir la oxidación fotosensible o recoger oxígeno atómico. La Tabla 3 indica los antioxidantes más usuales. El esquema general de la acción de los antioxidantes se observa en la Figura 5.

Tabla 3. Antioxidantes primarios (según su origen) que son comúnmente usados en los alimentos.

Adaptado. (Wanasundara & Shahidi, 2005).

Naturales	Sintéticos
Carotenoides	BHA (butilhidroxianisol)
Flavonoides	BHT (butilhidroxitolueno)
Ácidos fenólicos	AG (ácido gálico)
Tocoferoles y tocotrienoles	TBHQ (Terbutil hidroquinona)

- **Antioxidantes secundarios**

Los antioxidantes secundarios también se clasifican como preventivas o de clase II. Ofrecen su actividad antioxidante a través de diversos mecanismos para disminuir la frecuencia de las reacciones de oxidación (Tabla 4). La principal diferencia con los primarios es que en estos no se convierten los radicales libres en moléculas estables. Ellos actúan:

- Como quelantes para iones pro-oxidantes o catalizador de metal
- Proporcionando el hidrogeno a los antioxidantes primarios
- Descomponiendo el hidroperóxido de especies no radicales
- Desactivando oxígeno atómico

- Absorbiendo la radiación ultravioleta, actúa como eliminadores de oxígeno. A menudo mejoran la actividad antioxidante de los primarios.

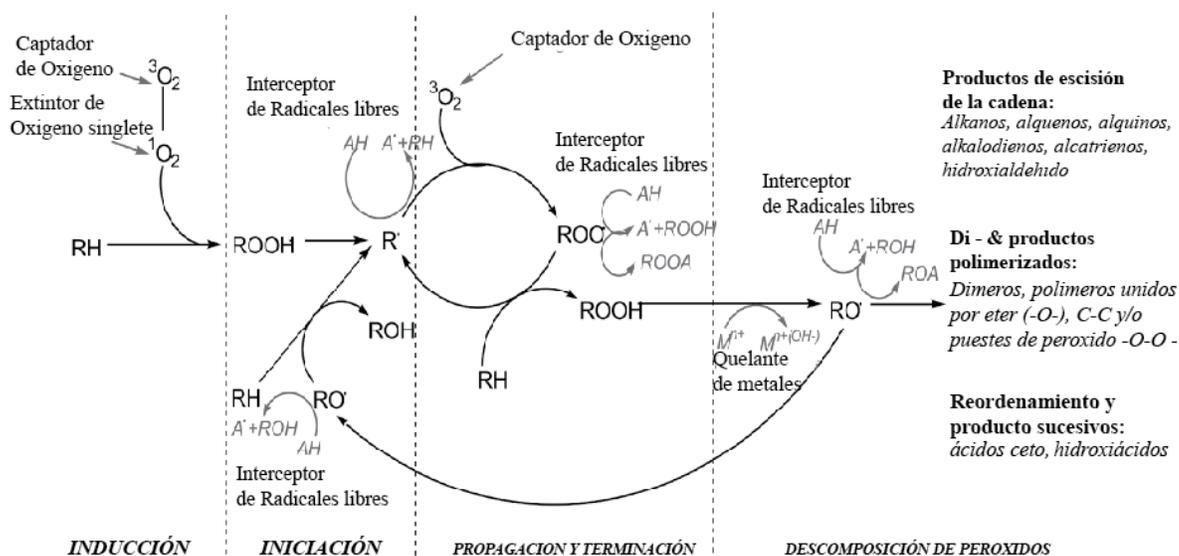


Figura 5. Posibles interacciones de los antioxidantes primarios y secundarios en las rutas de oxidación de lípidos.

Adaptado. (Wanasundara & Shahidi, 2005)

Tabla 4. Compuestos que exhiben actividad antioxidante secundaria. Adaptado de (Wanasundara & Shahidi, 2005).

Modo de actividad	Compuestos en uso
Quelación de metales	Ácidos Cítricos, malico, succínico y tartárico Ácido etilendiaminotetraacético, fosfatos.
Eliminación de oxígeno y agentes reductores	Ácido ascórbico, Palmitato de ascorbilo, Ácido eritorbico, eritorbato de sodio, sulfitos.
Bloqueo del oxígeno singlete	Carotenoides (β -Caroteno-licopeno y luteína)

4.1.4.4. La sinergia y sinergismo

El sinergismo es el efecto cooperativo de antioxidantes o un antioxidante con otros compuestos para producir una mayor actividad que la suma de las actividades de los componentes individuales cuando se usan por separado. La Figura 6 ilustra cómo se expresa el efecto sinérgico como la actividad antioxidante. Se observan dos tipos de sinergismo, uno que incluye únicamente antioxidantes primarios y la otra que implica una combinación de antioxidantes primarios con quelantes de metales o eliminadores de peróxido.

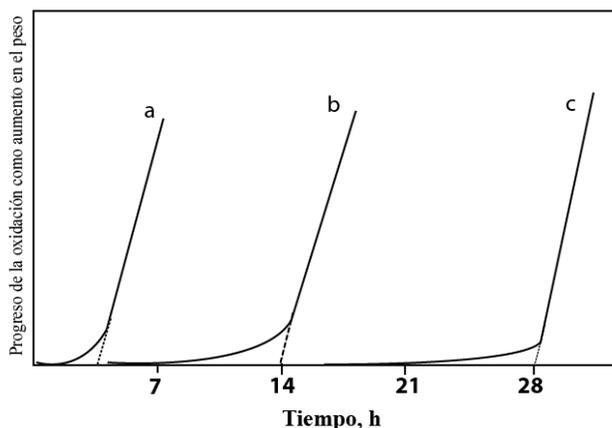


Figura 6. Efecto sinérgico de antioxidantes (a) 0,32% (p/p) Fosfatidiletanolamina (b) 0,02%(p/p), galato de propilo, y (c) es (a) + (b), evaluado en manteca de cerdo a 120°C, y el periodo de inducción fue usado para comparar la actividad antioxidante. Adaptado de (Wanasundara & Shahidi, 2005).

4.1.4.5. Evaluación de la actividad antioxidante (AA)

La actividad antioxidante de un compuesto dado se evalúa como resistencia a la oxidación de los lípidos en la presencia de ese compuesto en particular.

Para un conjunto fijo de condiciones de ensayo, la AA podría definirse independiente del método de ensayo. La Ecuación 13 (Wanasundara & Shahidi, 2005) establece una expresión para una situación que mide el tiempo como la variable independiente.

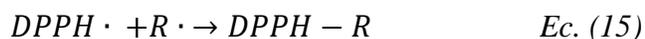
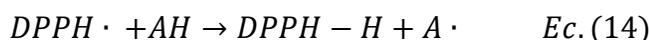
$$AA = \frac{\frac{t_{AH}}{t_{CONTROL}} - 1}{([AH])t_{CONTROL}} \quad \text{Ec. (13)}$$

Donde t_{AH} es el tiempo empleado por el sustrato para alcanzar un nivel predeterminado de oxidación basado en un método de ensayo (ver Anexo A), $t_{Control}$ es el tiempo del sustrato no tratado en alcanzar el mismo nivel de oxidación y $[AH]$ es la concentración de antioxidante en sus respectivas unidades.

De igual forma en este anexo se muestran los métodos reportados en la literatura o pruebas que se realizan para evaluar la actividad antioxidante, junto con algunos mecanismos de reacción de los métodos analíticos.

4.1.4.6. Ensayo de captación de radicales libres de DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidracil).

El radical 2,2 difenil-1-picrilhidracil, DPPH es uno de los compuestos que posee un radical protónico libre y muestra su absorción máxima a los 517 nm. Cuando el DPPH encuentra un secuestrador de radicales protónicos su color púrpura desaparece rápidamente (Azizah & otros, 2007), su mecanismo de reacción (Ec. 14 y 15) se basa en la reducción del radical por un antioxidante o por una especie radical a una especie no radicalaria (2,2 difenil picrilhidracina) (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995; Molyneux, 2004):



Este método es empleado si la actividad antioxidante de los extractos se debe a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides y otro tipo de polifenoles y es más selectivo que el método con el radical ABTS (Palomino, García, Gil, Rojano, & Durango, 2009).

4.1.4.7. Cuantificación de productos de oxidación en aceites

Las cadenas alquílicas de los ácidos grasos son mayormente susceptibles a ser atacadas en los dobles enlaces y en los carbonos alílicos, es decir, los que se encuentran adyacentes a dobles enlaces. Son las reacciones de foto-oxidación de carbonos alílicos y la producción de radicales libres las responsables del deterioro de los ácidos grasos insaturados, resultando en sabores rancios y calidad nutricional reducida (Scrimgeour, 2005).

- **Cuantificación de productos primarios de oxidación: Hidroperóxidos Totales (HPT)**

La reacción de oxígeno con lípidos insaturados produce una gran variedad de compuestos, siendo los hidroperóxidos el producto inicial. Comúnmente se miden por ensayo yodométrico (Nourooz-Zadeb & otros, 1995). Sin embargo, este presenta ciertas desventajas enunciadas por (Martínez & otros, 2005) como: *“interferencia del oxígeno molecular en la liberación de yodo, lo cual afecta el valor real del índice. Otra desventaja es que el yoduro de potasio reacciona con los peróxidos u otros productos similares de oxidación, por lo que el índice obtenido es una aproximación de estos peróxidos”*.

En la Figura 7 se ilustra el mecanismo de oxidación del ácido linólico o linoleico. En este tipo de reacciones ocurre una migración alílica del doble enlace, dando como resultado, en el caso del ácido linoleico y linolénico hidroperóxidos conjugados (Bailey A. E., 1984). En 1933 se descubrió que la formación de estos dienos conjugados en aceites daban lugar a un pico de absorción entre 230 y 235 nm en la región ultravioleta. En los 60s el monitoreo de la formación de dienos conjugados emergió como una técnica sencilla para el estudio de la oxidación lipídica y que arrojaba buenas correlaciones en comparación al índice de peróxido (IP). Sin embargo, el método puede ser afectado por la presencia de compuestos que absorben en la misma región, como los carotenoides (Shahidi & Zhong, 2005).

Es menester aclarar que la presencia de insaturaciones no es el único factor que afecta el ritmo de la oxidación; por el contrario, la facilidad de oxidación de un ácido graso se determina por la distribución de los enlaces dobles más que por el número de éstos. Por ejemplo, un grupo metileno entre dos enlaces dobles constituye un centro activo para la oxidación, como es el caso del ácido linoleico. Solo este grupo metileno lo hace diez veces más susceptible a la oxidación que el ácido oleico, que carece de este grupo (Bailey A. E., 1984).

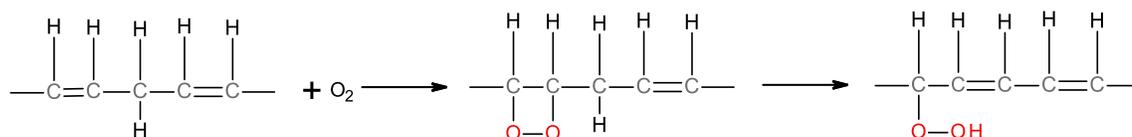


Figura 7. Oxidación de Ácido Linoleico. Formación de peróxido (compuesto intermedio), que luego pasa a hidroperóxido. Adaptado de (Bailey A. E., 1984)

En general, iones metálicos redox como el $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ and $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ son catalizadores efectivos de esta reacción y es por esto que se usan en el seguimiento de la oxidación de aceite, como precursores de la reacción, dando inicio al proceso de auto-oxidación (Scrimgeour, 2005).

Debido a que los hidroperóxidos alílicos son moléculas reactivas y se descomponen fácilmente por medio de una serie de reacciones complejas a compuestos más estables como aldehídos, cetonas, alcoholes, epóxidos, oligómeros, polímeros, entre otros (Scrimgeour, 2005), éste no puede tomarse como el ensayo único para determinar la cinética de oxidación

de un aceite. Es por esto que se hace necesario realizar el ensayo de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, el cual toma en cuenta los productos secundarios de la oxidación.

- **Cuantificación de productos secundarios de oxidación: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

El test del ácido tiobarbitúrico (TBA), actualmente, es uno de los más utilizados para detectar el deterioro producto de la oxidación en matrices grasas (Shahidi & Zhong, 2005).

Durante la oxidación lipídica, el ácido tiobarbitúrico reacciona principalmente con malondialdehído (MDA), el cual es un producto de descomposición de endoperóxidos formado durante la peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados que poseen tres o más dobles enlaces. En aceites comestibles el MDA se cree ser derivado principalmente de ácido linolénico (Nourooz-Zadeb & otros, 1995). El TBA es usado como un indicador del proceso de oxidación, ya que al reaccionar con el MDA se forma un complejo MDA-TBA (ver Figura 8) de color rosado que es medido espectrofómicamente entre 530 y 535 nm.

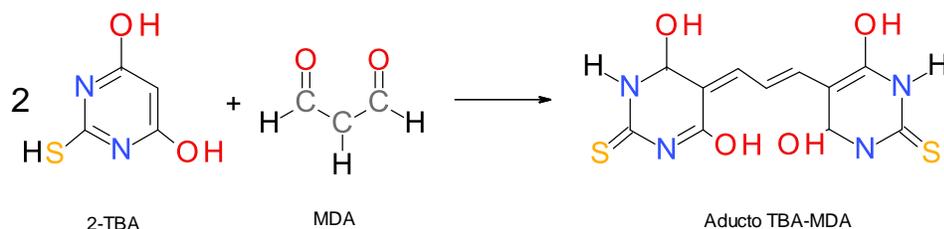


Figura 8. Reacción del Ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) con el malondialdehído (MDA). Adaptado de (Shahidi & Zhong, 2005).

4.1.5. Técnicas convencionales de extracción

La separación de mezclas en componentes esencialmente puros es de importancia en la fabricación de productos químicos. Las plantas poseen una variedad de mezclas de compuestos bioactivos tales como lípidos, grasas, fotoquímicos, fragancias, pigmentos y sabores que son ampliamente utilizados en la agroindustria alimentaria y no alimentaria, en la industria farmacéutica y en la industria cosmética.

Para separar estos compuestos (solutos) de la fase sólida, ésta se pone en contacto con una fase líquida, ambas fases entran en contacto íntimo y el (los) soluto(s) se difunde(n) desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su estructura

natural original. Este proceso se conoce como *lixiviación* y para realizarlo existen varios métodos.

Los métodos tradicionales de extracción requieren altos tiempos de residencia y grandes cantidades de solvente. Estos métodos se basan en la selección del solvente asociado con el uso de calor y/o agitación e incluyen el soxhlet, la hidrodestilación y maceración mezclada con agua, alcohol o grasa caliente. El soxhlet es una técnica estándar y la principal referencia para evaluar el rendimiento de otros métodos de extracción sólido – líquido.

4.1.5.1. Extracción con Soxhlet

Para la extracción con soxhlet se deben tener en cuenta: la selección del solvente, la matriz sólida y las condiciones de operación. El solvente más ampliamente utilizado para extraer aceites comestibles de las plantas es el hexano, otros solventes como isopropanol, etanol, hidrocarburos, e incluso el agua son utilizados (Velasco & otros, 2007). Durante la extracción con Soxhlet, el solvente se recupera normalmente por evaporación. Las temperaturas de extracción y evaporación tienen un efecto significativo en la calidad final de los productos.

4.1.6. Fluidos supercríticos

Es conocido que toda sustancia está caracterizada por un diagrama de fases que permite conocer el estado de agregación de la misma a cualquier valor de presión y temperatura. Mínimamente están definidos por tres líneas: de fusión, sublimación y vaporización (ver Figura 9). Esta última tiene la particularidad de desaparecer en un punto del diagrama, llamado punto crítico, a una presión y una temperatura que se denominan, presión y temperatura críticas. Estos valores son característicos de cada sustancia. Por sobre el Punto Crítico la sustancia no es ni un líquido ni un gas, sin embargo posee propiedades de ambos: se comporta como un gas al llenar y tomar la forma de su contenedor y tiene la densidad de un líquido, además de su poder disolvente (Valverde-García, 1995).

Un fluido supercrítico es aquel cuya temperatura (T) y presión (P) cumplen: $T > T_{crítica}$ y $P > P_{crítica}$. Tiene en general la densidad típica de un líquido pero su viscosidad es mucho menor que los valores típicos de un líquido y su coeficiente de difusión es mucho mayor que en los líquidos (Levine, 2004).

Algunas sustancias como el dióxido de carbono o el monóxido de di nitrógeno, alcanza el estado supercrítico a temperatura y presiones relativamente moderadas. Otras necesitan de condiciones muy drásticas para poder convertirse en fluido supercrítico, como el agua y el amoníaco (Tabla 5). Es por esto, que la facilidad con la que se alcance este estado será un factor determinante para la elección y posterior uso. El CO₂ es el fluido más utilizado, alcanza su valor a 31°C y 73 atm.

Tabla 5. Temperatura y presión crítica de sustancias usuales. Adaptado de (Valverde García, 1995).

Fluido	Temperatura crítica (°C)	Presión Crítica (atm)
CO ₂	31	73
N ₂ O	36	72
NH ₃	133	112
H ₂ O	374	217

El atractivo que presentan los fluidos supercríticos para ser utilizados como agentes extractores radica en que poseen densidades similares a las de los líquidos, y por tanto similares propiedades disolventes, pero a la vez su viscosidad es mucho menor, lo que hace que los coeficientes de difusión de los solutos en un fluido supercrítico sean mucho mayores que en un disolvente líquido. Por lo tanto, las extracciones con esta técnica serán tan completas como la de disolventes líquidos y en segundo lugar, mucho más rápidas y eficientes, por su baja viscosidad, que favorece los fenómenos de transferencia de masa y penetrabilidad en los poros de la matriz de la muestra (Valverde-García, 1995).

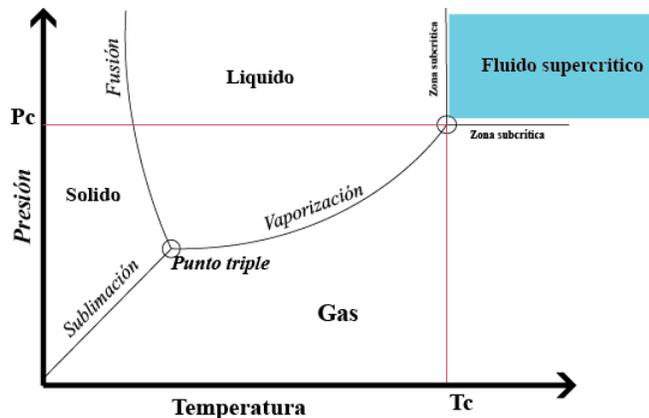


Figura 9. Temperatura y presión crítica de sustancias usuales. Adaptado de (Valverde García, 1995)

4.1.7. Extracción con fluidos supercríticos (EFS)

En esencia, el proceso de extracción con fluidos supercríticos es similar a la de una extracción clásica, con la particularidad de utilizar un agente extractor diferente. Esta peculiaridad permite que la extracción se aproxime a las condiciones exigidas en un proceso ideal, lo cual debe ser rápido, simple, barato, no contaminante, selectivo, aplicable a analitos termolábiles y conducir a la obtención de extractos finales listos para su análisis.

En principio, la extracción dinámica ofrece mejores y más rápidas recuperaciones, con esta forma de operación, durante el proceso de extracción, se produce la continua renovación del fluido que entra en contacto con la muestra, lo que hace que sea difícil que el fluido pueda llegar a saturarse. No obstante el modelo estático, permite una mayor penetración del fluido en los poros de la matriz de la muestra, así como el que se pueda alcanzar el equilibrio de reparto del analito entre la matriz y el fluido. Esta es la razón de que, en la práctica, las extracciones suelen llevarse a cabo realizando una extracción estática, a la que sigue una extracción dinámica (Valverde-García, 1995).

4.1.7.1. Variables importantes

Cuando se quiere desarrollar un método de EFS, además de seleccionar el agente extractor adecuado para una determinada combinación analito/matriz, es necesario optimizar las diferentes variables que influyen en el proceso de extracción y en el de colección de los analitos. Las principales variables a tener en cuenta son: densidad del fluido (presión y temperatura), tipo de extracción (dinámica, estática), volumen y velocidad del fluido o tiempo de extracción, modificador (tipo y forma de adición), características de la muestra (tamaño de partícula, grado de humedad, etc.), tipo de restrictor y sistema de colección (volumen de disolvente o material adsorbente y disolvente de elución, temperatura, etc.) (Valverde-García, 1995).

4.1.7.2. Dióxido de Carbono como Fluido Supercrítico

El CO₂ es el solvente frecuentemente usado para la EFS debido a sus ventajas prácticas, las que incluyen su carácter no-tóxico, no inflamable, seguro para el ambiente, de gran disponibilidad, de bajo costo a alta pureza y su conveniencia para extraer compuestos

termolábiles y compuestos con baja volatilidad y polaridad. Cuando el extracto se recupera en los separadores, el CO₂ es fácilmente separado debido a su alta volatilidad. Otra de las ventajas es que el poder de extracción del CO₂ y otros fluidos supercríticos puede ser ajustado por pequeños cambios en la presión y temperatura de extracción (Silva-Chandía, 2012).

Además, la solubilidad del CO₂ también va siendo menor a medida que aumenta el peso molecular de los compuestos a disolver. Sin embargo, esta característica puede no ser una desventaja, puesto que confiere una mayor selectividad en la extracción de compuestos y más posibilidades en el fraccionamiento de los mismos (Vázquez, 2008).

4.2. ANTECEDENTES

4.2.1. Antioxidantes

En 1797 se registra la primera observación científica de un inhibidor de oxidación, por parte de Berthollet (Moureu & Dufraise, 1926) y luego de Davy (Wisniak, 2010). Duclaux fue el primero en demostrar la participación de oxígeno atmosférico en la oxidación de ácidos grasos libres. Luego, fue descubierto que la oxidación de acilglicérols insaturados podía generar olores rancios en el aceite de pescado (Wanasundara & Shahidi, 2005).

De 1843 data el trabajo más temprano reportado del uso de antioxidantes para retardar la oxidación de lípido, en el cual Deschamps mostró que una pomada hecha de manteca de cerdo fresca que contiene goma de benzoína (que a su vez contiene vainillina) o Populin (a partir de yemas polares, contiene saligenina y derivados) no adquirió un sabor ni olor rancio como sucedió con la manteca de cerdo pura (Moureu & Dufraise, 1926).

Curiosamente, los primeros informes sobre los antioxidantes utilizados para los lípidos alimentarios trataron sobre el uso de fuentes naturales; en 1852, Wright reportó que la corteza del olmo fue eficaz en la preservación de la grasa de mantequilla y manteca de cerdo. Chevreal (Chevreal, 1856) mostró que las maderas de roble, álamo y pino (en el orden decreciente de eficacia) retardaron el secado de las películas de aceite de linaza aplicado en ellos, y que a las tres por igual les tomó mucho más tiempo en secarse que el vidrio.

De igual forma, Moureu y Dufraise (1922) informaron por primera vez la posibilidad de utilizar productos químicos de síntesis, especialmente de los compuestos fenólicos, para retardar la descomposición oxidativa de los lípidos alimenticios. Su trabajo proporcionó la

información básica que llevó a las teorías de la oxidación de lípidos y antioxidantes, los cuales se conocen como "catálisis inversa" (Wanasundara & Shahidi, 2005).

La investigación sistemática de la actividad antioxidante basado en el modelo de la química de la peroxidación en cadena de radicales de los productos químicos fue reportado por Lowry y sus colegas (Wanasundara & Shahidi, 2005) de la Asociación de Productores de Caucho de Investigación británica.

El fenómeno de sinergismo antioxidante en alimentos se informó por primera vez por Olcott y Mattill, y esto fue significativo en el logro de la estabilidad oxidativa en los alimentos mediante el uso de una combinación de antioxidantes que se encuentran en la fracción insaponificable de los aceites: Se describen los antioxidantes como inhibidores y los agrupan en tipo ácido, inhibidores, e hidroquinona y fenoles (Wanasundara & Shahidi, 2005).

Bailey (Bailey K. C., 1937) y Scott (Scott, 1865) han proporcionado a la historia un análisis descriptivo de la evolución de los antioxidantes en sus libros, *"El retraso de las reacciones químicas"* y *"Los antioxidantes y autooxidación"*, respectivamente.

Desde principios de la década de 1960, la comprensión de la auto-oxidación de los lípidos insaturados y los mecanismos antioxidantes ha avanzado de manera significativa como resultado del desarrollo de herramientas analíticas eficaces. Las dos últimas décadas han sido muy importantes para la investigación sobre antioxidantes. En todo el mundo se observa un renacimiento en el estudio de los antioxidantes naturales presentes en los alimentos y los beneficios potenciales para la salud de los antioxidantes naturales en relación con la prevención y el tratamiento del estrés oxidativo y enfermedades relacionadas. El énfasis ha sido en gran medida de sus implicaciones en las reacciones biológicas vitales que tienen una relación directa con la lesión de los tejidos y las enfermedades degenerativas. Evidencias científicas suficientes ya se han acumulado en relación a estas condiciones con los radicales libres y especies reactivas de oxígeno. La búsqueda de la comprensión de la oxidación de los lípidos y su prevención y control se ha mantenido desde tiempos históricos y perdura hasta nuestros días (Wanasundara & Shahidi, 2005).

4.2.2. Antioxidantes naturales

Gran parte del interés en los antioxidantes de origen natural se desarrolla debido a la tendencia a minimizar o evitar el uso de aditivos alimentarios sintéticos. El esfuerzo continuo en la búsqueda de compuestos naturales como antioxidantes durante los últimos 20 años ha contribuido al desarrollo de modelos eficientes para la detección de la actividad, la evaluación de la relación estructura-función, la categorización de las fuentes de los grupos de antioxidantes, el desarrollo de métodos de aislamiento de compuestos antioxidantes purificados a partir de fuentes naturales, y el desarrollo de alimentos de marca (por ejemplo, las reclamaciones por finalidad la comercialización). Es de destacar que los componentes obtenidos a partir de plantas han sido catalogados como “antioxidantes seguros y naturales”, encontrándose en alimentos regularmente consumidos. Si éstos se deben añadir a los alimentos que se consumen en gran parte, deben someterse a todas las medidas de seguridad, por lo que solo unos pocos se encuentran aprobados para su consumo (Wanasundara & Shahidi, 2005).

4.2.3. Compuestos fenólicos de origen natural usados como antioxidantes

Se ha reportado que las plantas son ricas en un sinnúmero de compuestos fenólicos en su grupo metabolito secundario. Entre éstos, ácidos fenólicos y derivados polifenólicos constituyen la serie más importante de antioxidantes hidrófilo-hidrófobo, compuestos presentes de forma natural en las plantas. En los alimentos, estos compuestos polifenólicos actúan como eliminadores de radicales o quelantes de metales, y algunos pueden jugar un papel multifuncional (Azizah & otros, 2007). Numerosas plantas y sus partes han sido identificadas como fuentes de ácidos fenólicos, flavonoides y compuestos relacionados. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos de diferentes fuentes de la planta se ha reportado en varios estudios revisados por especialistas, revisiones y libros. Los lectores interesados hacen referencia de las revisiones realizadas por Shahidi et al, sobre las fuentes de compuestos fenólicos naturales que poseen actividad antioxidante que se obtienen a partir de plantas y tienen aplicaciones potenciales en los aceites y grasas (Wanasundara & Shahidi, 2005). Existe una amplia identificación de compuestos fenólicos en la literatura científica, de los cuales aquí se engloban de los más comunes:

4.2.4. Aprovechamiento del cacao y sus compuestos fenólicos

El cacao era consumido por los Mayas, como una bebida llamada “*Xocoatl*”; su uso por los españoles comenzó en 1550 cuando unas religiosas le añadieron dulce y vainilla a esta bebida, dejando a un lado el sabor amargo que lo caracterizaba (Murillo-Crespo, 2008).

Expertos en la fabricación de productos a base de cacao, determinaron que el rendimiento de 100 Kg de semillas de cacao es alrededor del 85%, su valor restante es considerado desechos (cáscara, granza, triturado, maguey o venas del cacao). De estos desechos, sólo la cascarilla de cacao corresponde el 12% (Murillo-Crespo, 2008).

Para las industrias cacaoteras del país como del mundo, representa un grave problema deshacerse de este desecho, debido a que su actividad genera un impacto ambiental negativo. Ante esta situación, las industrias han motivado el desarrollo de estudios a nivel de campo para aumentar el valor comercial de la producción de cacao, a través de la reincorporación de la cascarilla de cacao a procesos industriales como alternativa alimenticia para animales menores.

Algunos alimentos y bebidas que no están clasificados como funcionales contienen sustancias caracterizadas como antioxidantes de origen natural y pueden proporcionar los mismos beneficios ofrecidos por los alimentos funcionales. Esto es cierto en el caso del té verde (Mckay & Blumberg, 2002) el vino tinto y el chocolate (Hammerstone & otros, 2000). El cacao también hace parte de este grupo: es inusualmente rico en polifenoles, pero la cuantificación y caracterización precisa, y mucho menos del contenido de polifenoles es de reciente desarrollo (Wanasundara & Shahidi, 2005).

Los polifenoles en granos de cacao se almacenan en las células de pigmento de los cotiledones. Tres grupos de polifenoles se pueden distinguir, todos de tipo flavanoles: las **catequinas** o flavan-3-oles (ca. 37%) (monómeros), **antocianinas** (ca. 4%) (dímeros) y **proantocianidinas** (ca. 58%) (polímeros). Se pueden destacar el chocolate y el vino como las fuentes mayoritarias de catequina (Wollgast & Anklam, 2000; Quiñones & otros, 2012).

La cantidad total de polifenoles solubles en la masa libre de grasa seca de grano fresco de cacao es de 15 a 20% equivale a aproximadamente 6% en los granos de cacao secados al aire, que contiene 54% de grasa y 6% de agua, en granos fermentados aproximadamente 5% (10%

y más que se considera un signo de una mala fermentación). Estos valores son válidos para los granos de la variedad Forastero, los granos de cacao variedad Criollo tienen aproximadamente 2/3 de la cantidad de polifenoles. Antocianinas no se han encontrado (Lange & Fincke, 1970). En resumen, los diferentes polifenoles que han sido identificados en los granos de cacao o de productos derivados del cacao se han reportado por Jan Wollgast (Wollgast & Anklam, 2000).

4.2.1. Extracción de antioxidantes asistidos con fluidos supercríticos

Desde su desarrollo a finales de 1980, la extracción con fluidos supercríticos (EFS) se ha enfrentado sucesivamente un interés creciente en la década de 1990. De hecho, a pesar de algunos inconvenientes importantes y la concurrencia de otras técnicas de extracción, la EFS sigue apareciendo como una técnica de extracción amigable con el medio ambiente que ofrece la selectividad única, además de otras ventajas, como el tiempo y bajo consumo de disolvente. Aplicaciones a ambos contaminantes orgánicos e inorgánicos de matrices ambientales se han presentado para ilustrar la aplicabilidad de la EFS. También se analizan las tendencias de futuro en el ámbito del medio ambiente (Camel, 2013).

Los métodos comúnmente usados para la extracción de compuestos antioxidantes en plantas involucran la aplicación de solventes de distinta polaridad, con el inconveniente de manejar grandes volúmenes de solvente, acompañada de un alto costo y del cuestionamiento del uso de los mismos. Recientemente ha habido un interés creciente en el uso de la extracción con fluidos supercrítico con Dióxido de Carbono (CO₂) como solvente. Este proceso usa las propiedades de los gases por sobre sus puntos críticos para extraer en forma selectiva los componentes solubles de una materia prima (Silva-Chandía, 2012).

En resumen, en el trabajo de Herrero, 2006 se proporciona una visión actualizada sobre las principales aplicaciones de los dos procesos de limpieza, extracción con fluidos supercríticos y la extracción con agua subcrítica, utilizados para aislar los productos naturales de diferentes materias primas, tales como plantas, alimentos subproductos, algas y microalgas. (Herrero, Cifuentes, & Ibañez, 2006).

4.2.2. CO₂ supercrítico como agente extractor de antioxidantes.

Se ha reportado que en proceso de extracción de polifenoles con Dióxido de Carbono supercrítico (CO₂ – SC) se puede llevar a cabo a una temperatura moderada que, además de tener un bajo consumo de energía, evita la degradación de los compuestos termosensibles, a diferencia de los procesos tradicionales, tales como la destilación y la extracción con disolventes líquidos donde se requieren temperaturas más altas.

Los polifenoles se pueden extraer a través de disolventes tales como agua, metanol, etanol, acetato de etilo y acetona o una mezcla de estos disolventes. La extracción supercrítica usando CO₂ y un co-disolvente puede ofrecer ventajas sobre los métodos tradicionales para la obtención de estos compuestos (Sarmiento & otros, 2008).

4.3. ESTADO DEL ARTE

En los últimos años se ha consolidado una tendencia mundial hacia la obtención de antioxidantes naturales para la industria alimenticia (Rodríguez-Rojo & otros, 2012), proveniente no solo de materia prima de primera generación sino de residuos provenientes de la actividad agrícola y agroindustrial. Entre estos se destaca la cáscara de la semilla del cacao, residuo agroindustrial de la industria chocolatera del cual se reporta que presenta una cantidad considerable de compuestos polifenólicos, los cuales son reconocidos por sus propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas, anti-inflamatorias y antibacterianas (Cuéllar & Guerrero, 2012; Wollgast & Anklam, 2000), y que incluso podría prevenir enfermedades como la obesidad y la diabetes tipo 2 (Dorenkott, y otros, 2014). A pesar de esto, su uso más comercial es en forma de harina base para la preparación de galletas y otros productos para las personas que padecen de estreñimiento y de problemas de colon por su contenido en fibra dietaría y alto valor nutritivo (Molienda Perú, 2012; Abarca & otros, 2010) o simplemente como biomasa para la producción de electricidad (Fedecacao, 2009).

Las investigaciones recientes en Colombia se han encontrado enfocadas en el estudio de la semilla del cacao. Se realizó un estudio comparativo de la cantidad de polifenoles y mediciones de actividad antioxidante para diferentes zonas geográficas de cultivo, la cual sugiere que a menor altitud se obtendrá un cacao más rico en polifenoles, flavan-3-oles y epicatequina (Carrillo & otros, 2014), así como se ha estudiado la extracción de manteca de

cacao utilizando CO₂ supercrítico a partir de polvo de cacao a nivel de planta piloto (Cabezas & Bolaños, 2013) y el efecto que tienen las etapas de fermentación (Zapata-Bustamante & otros, 2013) y tostado (Perea-Villamil & otros, 2009) que si bien son estudios que se vienen realizando desde hace algunos años en otras partes del mundo (Niemenak & otros, 2006; Azizah & otros, 2007; Wollgast & Anklam, 2000), en este país son de reciente interés debido a la demanda creciente e incentivo a la producción del fruto (Ministerio de Agricultura, 2013; Sandoval, 2011).

Por su parte, el único estudio que se ha encontrado en donde se utiliza como materia prima la cáscara de la semilla del cacao es el realizado por Cuellar y Guerrero (2012), donde se hicieron mediciones de capacidad antibacteriana a partir de extractos soxhlet de la cáscara. A nivel mundial el único estudio que se ha encontrado de extracción de antioxidantes a partir de la cáscara de la semilla de cacao con fluidos supercríticos fue el realizado por Arlorio y otros, 2005, el cual realiza este tipo de mediciones, además de la capacidad biológica. Sin embargo, en Colombia no se han reportado estudios de este tipo utilizando cáscara de cacao proveniente de este país.

Tradicionalmente la técnica usada entre los métodos de extracción no convencionales ha sido el CO₂ supercrítico debido a que es un solvente ecológico y su utilización no representa una amenaza para la salud humana. Sin embargo, recientes investigaciones se han enfocado en ampliar esa variedad de solventes a otros igual de inocuos como el agua y etanol en forma de líquidos presurizados, o utilizando este último como co-solvente con el fin de favorecer la polaridad y extraer fitoquímicos de plantas como el romero, cuyo proceso de extracción resulta ineficiente utilizando CO₂ supercrítico (Rodríguez-Rojo & otros, 2012; Ibáñez, 2013; Saldaña, 2013).

Así mismo, el agua supercrítica, a pesar de ser un proceso limitado por su alto costo, encuentra aplicaciones en la solubilización de celulosa presentando una alta selectividad que permite el fraccionamiento de la biomasa para la obtención de hemicelulosa, celulosa y lignina, posicionándose como una nueva forma prometedora de obtener productos químicos de valor agregado a partir de materia prima renovable (Cocero, 2013; Cantero & otros, 2013).

Otro proceso conocido por su alto costo es la extracción con fluidos supercríticos a altas presiones (superiores a 700 bar). A pesar de esto, recientes estudios han indicado que los extractos son enriquecidos con ingredientes que pueden ser obtenidos solamente bajo estas condiciones, así como permite la rápida extracción de aceites de semillas y mezclas de lípidos (King, 2013).

La extracción a altas presiones está apuntando hacia nuevos horizontes. A pesar de los inconvenientes económicos en su contra existe la teoría de que a gran escala estos procesos lograrían ser más rentables. Del Valle, 2013, propone un escalamiento a nivel industrial en el que un número superior a tres vasijas de extracción para un mismo volumen total, un tamaño de partícula de 2mm y presiones superiores a 30 MPa harían del proceso mucho más rentable que a escala laboratorio, como tradicionalmente se ha hecho. La evaluación económica fue realizada para la extracción de aceite vegetal (Del Valle, 2013).

En Latinoamérica, la producción científica en materia de fluidos supercríticos y otros métodos extractivos a altas presiones ha aumentado en los últimos tres años. La evidencia de esto es que el mayor número de avances en el área se han dado dentro en este periodo de tiempo. Colombia se encuentra entre los cinco primeros países latinoamericanos con mayor producción científica en el tema, abordando temas como reacciones con fluidos supercríticos, estudios termodinámicos y extracciones. Éste último, es el tema que abarca mayor desarrollo investigativo. (Moraes, 2013).

5. METODOLOGÍA

5.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

El presente proyecto se realizó mediante una investigación de tipo cuantitativa experimental y exploratoria. Se tomaron los resultados de las pruebas experimentales para evaluar la viabilidad económica del proceso. El esquema metodológico es presentado en un diagrama de flujo a través de la Figura 20.

5.2. TECNICAS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

La principal fuente de información para el presente proyecto fueron los datos experimentales obtenidos en los diferentes ensayos realizados en los laboratorios del departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá durante 5 meses.

Las fuentes de información secundaria fueron tesis de grado y artículos obtenidos a partir de bases de datos principalmente Science Direct, los cuales aportaron información actualizada sobre las condiciones de operación, costos y metodología para la extracción de antioxidantes mediante el uso de fluidos supercríticos.

5.3. VARIABLES

La Tabla 6 indica las variables del diseño experimental empleado para la extracción con CO₂ supercrítico.

Tabla 6. Operacionalización de las variables. Diseño experimental 2. .

TIPO DE VARIABLE	VARIABLE	DEFINICIÓN	UNIDAD
Independiente	Porcentaje de co-solvente (Etanol)	Masa de etanol a adicionar con respecto a la masa total de CO ₂	% (p/p)
	Presión	Presión de CO ₂ en la vasija de operación durante la extracción en un proceso tipo Batch	bar
Dependiente	Actividad antioxidante	Capacidad de los compuestos antioxidantes para atrapar radicales libres	μmol de trolox/g de cacao
	Cantidad de compuestos fenólicos	Compuestos fenólicos presentes en el extracto final obtenido.	mg-eq AG/g muestra seca
Interviniente	Número de lote	Número de lotes de extracción del CO ₂ supercrítico en la vasija durante la extracción.	Lotes

	Tamaño de Partícula.	Tamaño de la cáscara de la semilla de cacao homogenizado mediante tamizado	mm
	Temperatura	Temperatura del CO ₂ en la vasija de operación durante la extracción en un proceso tipo batch.	°C

5.4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.4.1. Muestra: Preparación de la muestra y caracterización

La cáscara de *Theobroma cacao* L. fue obtenida de semillas de cacao colombiano fermentadas, pre-tratadas con infrarrojo y deshidratadas (muestra totalmente seca) de un mismo lote, suministradas por Casa Luker®. Inicialmente se homogenizó la muestra y luego fue molida mediante molino eléctrico y manual, y tamizada a un tamaño de partícula de 1,18-0,30 mm (AOAC International, 2000). El material obtenido se almacenó a temperatura ambiente (15°C) en bolsas ziploc hasta el momento de utilización de la muestra. La materia prima fue caracterizada mediante un análisis proximal, midiendo contenido de humedad, grasa, fibra, nitrógeno (proteína) y cenizas, siguiendo algunos métodos de la *Association of Analytical Communities* (AOAC) (Arlorio & otros, Characterization of pectins and some secondary compounds from *Theobroma cacao* hulls, 2001; AOAC International, 2000) con algunas modificaciones. Estos resultados fueron comparados con un trabajo anterior (Arlorio & otros, Characterization of pectins and some secondary compounds from *Theobroma cacao* hulls, 2001) y la patente n° ES2099676 de 1997, con el fin de mirar diferencias entre la cascarilla de cacao producida en Colombia y la de otras partes del mundo. Todas las pruebas de análisis proximal (excepto fibra dietaría total y proteína) se hicieron por triplicado.

5.4.1.1. Contenido de Humedad

Debido a que la muestra de cáscara suministrada es deshidratada, el ensayo se realizó con la cáscara de semillas de cacao fermentadas, proporcionadas por la misma empresa, a las cuales se les retiró la cáscara. Siguiendo el método 931.04 de la AOAC para humedad en productos de cacao (AOAC International, 2000), se pesó 1,0 g de muestra en una caja de petri y se llevó a peso constante en una estufa Memmert a 100°C. Se dejó enfriar las muestras en un desecador y se reportó la pérdida de peso en agua, siguiendo la ecuación:

$$\text{Humedad} [\%] = \frac{\text{muestra inicial} - \text{muestra seca}}{\text{muestra inicial}} * 100 = \left[\frac{g H_2O}{g \text{ muestra}} \right] \quad \text{Ec. (15)}$$

5.4.1.2. Contenido de Grasa

Este se realizó por medio de un aparato de extracción Goldfish con bencina de petróleo 40-60°C marca Chemi. La extracción se llevó a cabo durante 4 horas, utilizando 2,0 g de muestra seca. El contenido de grasa se expresó de la siguiente manera:

$$\text{Grasa} [\%] = \frac{\text{Peso vaso con grasa} - \text{Peso vaso vacío}}{\text{muestra inicial}} * 100 \quad \text{Ec. (16)}$$

5.4.1.3. Contenido de Fibra dietaría total

Éste se realizó con un kit para la determinación de contenido total de fibra (Sigma-Aldrich), por una combinación de métodos enzimáticos y gravimétricos, basado en el procedimiento 985.29 publicado en la 16° edición de los métodos oficiales de la AOAC (AOAC International, 1997). Las muestras desengrasadas y secas fueron digeridas con las enzimas α -amilasa, proteasa y amiloglucosidasa, de forma sucesiva, para remover la proteína y el almidón presente en la muestra. Luego se añadió etanol para precipitar la fibra dietaría soluble. El residuo fue filtrado y lavado con etanol y acetona, secado y pesado. La fibra dietaría total es el peso del residuo menos el peso de las proteínas y las cenizas. Este ensayo se realizó por duplicado.

$$\%FDT = \frac{\text{muestra digerida}}{\text{muestra inicial}} * 100 - \%Proteína - \%Cenizas \quad \text{Ec. (17)}$$

5.4.1.4. Contenido de Proteína

Se siguió el método 970.22 para la determinación de Nitrógeno total en productos de cacao (AOAC International, 2000), utilizando 0,5 g de muestra desengrasada. Se realizó la digestión de la muestra con un digestor DK series de Velp Scientifica, de acuerdo al método Kjeldahl (AOAC International, 2000) por 1 hora. Posteriormente las muestras fueron destiladas con ayuda de una unidad de destilación UDK 129 de Velp Scientifica. Finalmente, se realizó una titulación con HCl 0,2 N (N_{HCl}).

$$\%N = \frac{(Vm - Vb) \text{ mL} * N_{HCl} * 0,014}{g \text{ muestra}} * 100 \quad \text{Ec. (18)}$$

$$\% \text{ Proteína} = \%N * 6,25 \quad \text{Ec. (19)}$$

$\%N = \% \text{ de Nitrógeno}$

$V_m = \text{Volumen de HCl consumido por la muestra en mL}$

$V_b = \text{Volumen de HCl consumido por el blanco en mL}$

5.4.1.5. Contenido de Cenizas totales

Se pesaron 0,5 g de muestra en un crisol previamente secado en una mufla marca E&Q a 120°C por 2 horas hasta peso constante. Luego, se carbonizó la muestra en una plancha de calentamiento Heidolph MR3001 a 250°C. Se ingresó la biomasa a la mufla, haciendo rampas de calentamiento hasta llegar a 550°C. Luego de llegar a la temperatura deseada se dejó en la mufla por 4 horas. La muestra se dejó enfriar haciendo rampas de temperatura al igual que en el inicio, pasó al desecador y se pesó tan pronto llegara a la temperatura ambiente. El contenido de cenizas se expresó de la siguiente manera:

$$\text{Cenizas [\%]} = \frac{\text{Peso crisol con muestra} - \text{Peso crisol vacío}}{\text{muestra inicial}} * 100 \quad \text{Ec. (20)}$$

5.4.2. Extracción Soxhlet a presión reducida

Se realizaron extracciones sucesivas y exhaustivas durante 8 horas con solventes de distinta polaridad, utilizando vacío con el fin de disminuir la temperatura de extracción y evitar la degradación de posibles analitos termolábiles. La Figura 10 muestra las condiciones y la secuencia en que se obtuvieron los seis extractos. Luego de obtener los extractos se separó la fase grasa presente de la fase disolvente centrifugando por 20 minutos a 5000 RPM y -15°C. Se utilizó una centrífuga Hettich Universal 320R. En la Figura 11 se observa la apariencia del centrifugado y sobrenadante.

El rendimiento de la fase solvente se obtuvo rotavaporando el extracto para obtener el peso libre de solvente, utilizando un rotavapor Büchi R-114. Con esto, se obtuvieron rendimientos diferenciados para cada una de las fases respectivamente. La prueba se realizó por triplicado. Los extractos de solvente obtenidos se almacenaron en tubos falcon y en oscuridad, a -20°C.

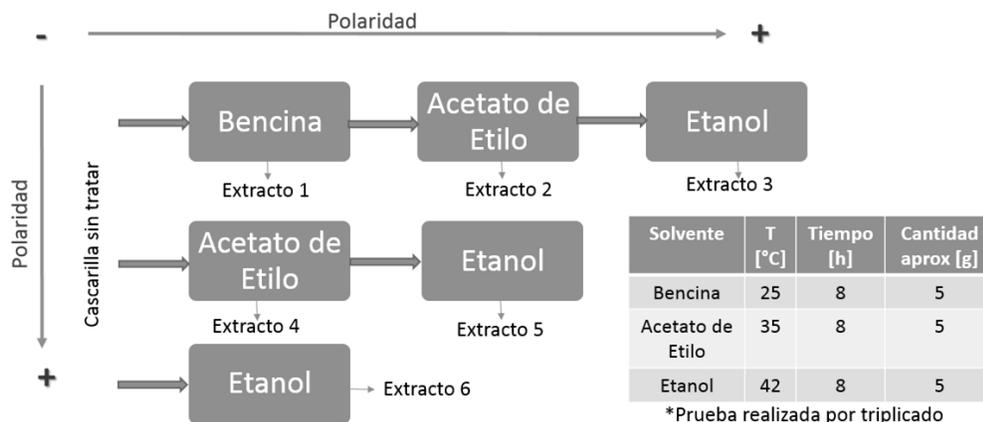


Figura 10. Forma de obtención de los extractos soxhlet y condiciones de extracción. .

5.4.3. Extracción con CO₂ supercrítico

Se cargó una cantidad determinada de muestra en el recipiente de extracción y se fijaron las condiciones del ensayo de acuerdo al diseño experimental (una temperatura de 60°C, presión y % de cosolvente variables). El etanol fue cargado a la celda de extracción utilizando una bomba para HPLC Beckman modelo 140A. Luego de rotaevaporar cada extracto se determinó su peso libre de solvente, con el propósito de calcular el rendimiento (mg extracto/g muestra) (Peralta-Bohórquez, y otros, 2008), tanto en fase etanólica, como en fase grasa, siguiendo la metodología empleada en la extracción soxhlet.

Los extractos obtenidos se almacenaron en tubos falcon y en oscuridad, a -20°C (Locatelli, y otros, 2013; Carrillo & otros, 2014; Perea-Villamil & otros, 2009). Se efectuó una extracción tipo batch (Sunarso & Ismadji, 2009) con un numero de lotes sujeto a la determinación del tiempo óptimo de extracción.

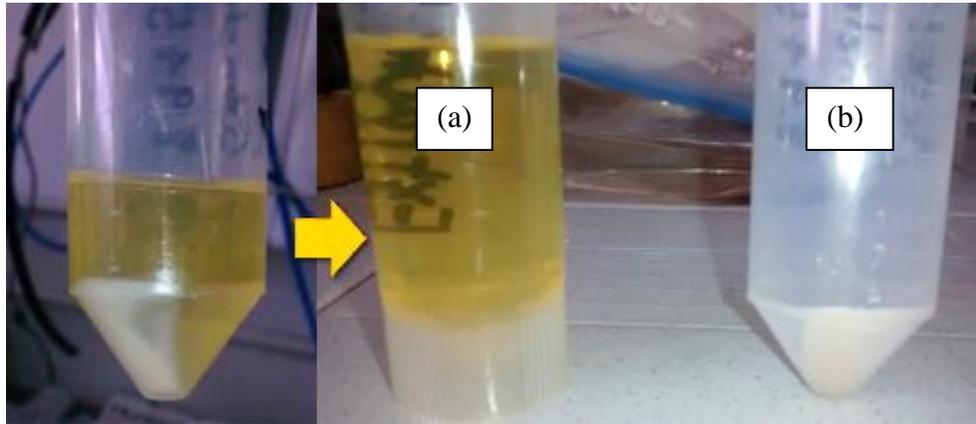


Figura 11. Apariencia del extracto después de centrifugar y separar las dos fases, sobrenadante (a) y centrifugado (b).

5.4.3.1. Equipo de extracción

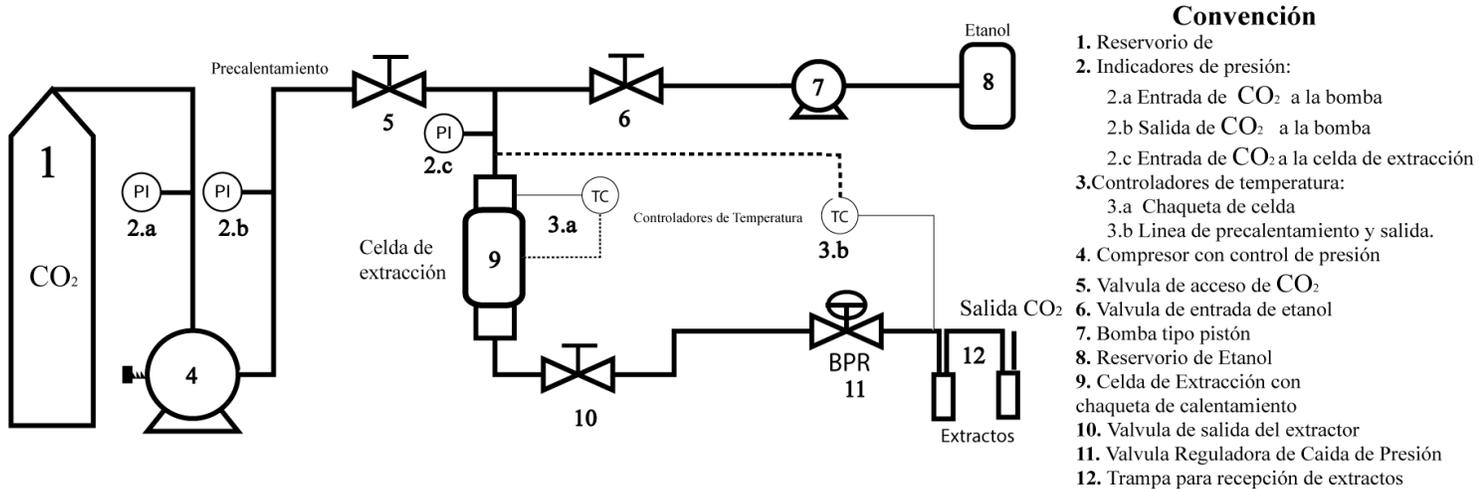


Figura 12. Equipo para la extracción supercrítica.

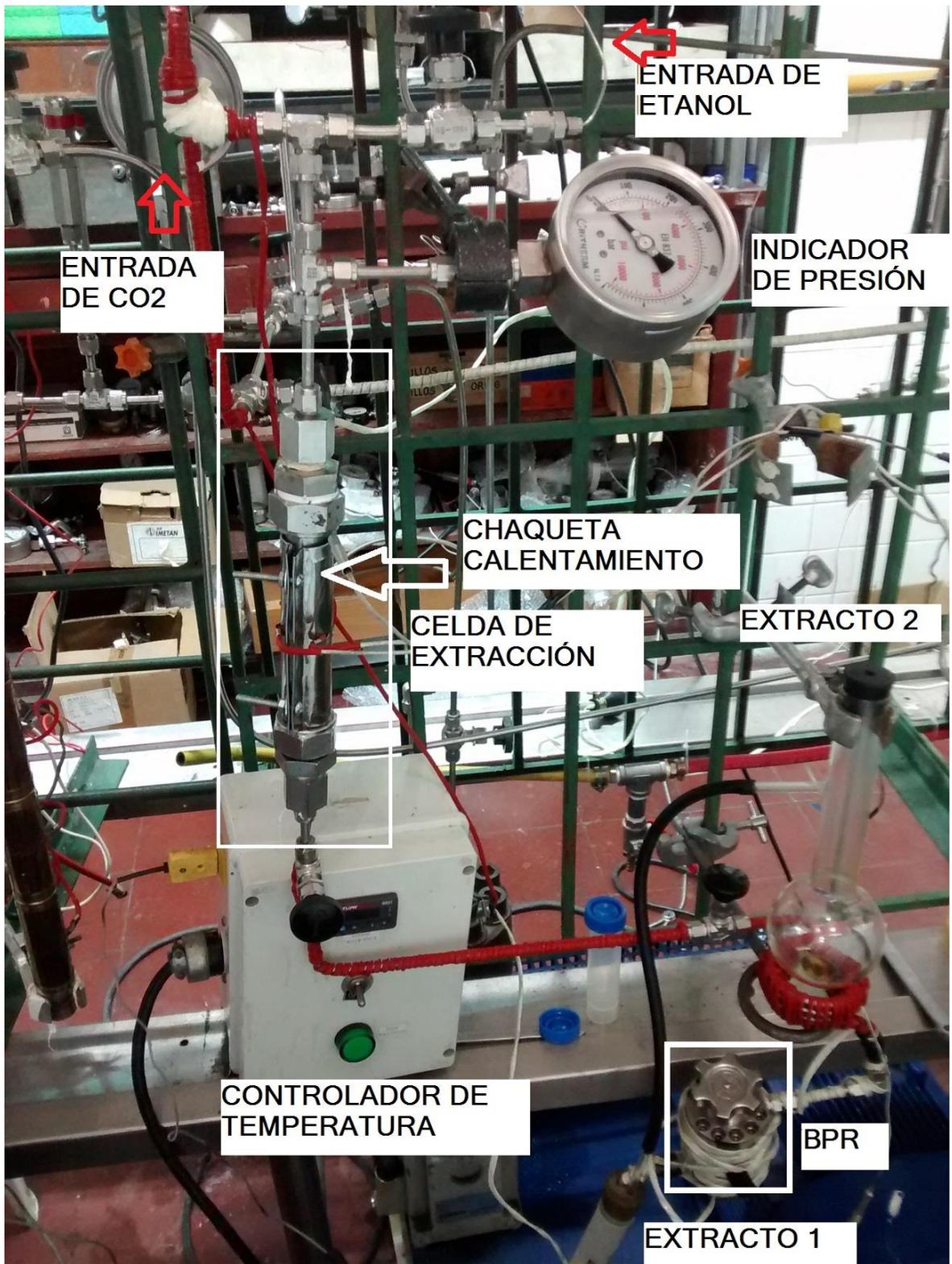


Figura 13. Equipo de extracción supercrítica.

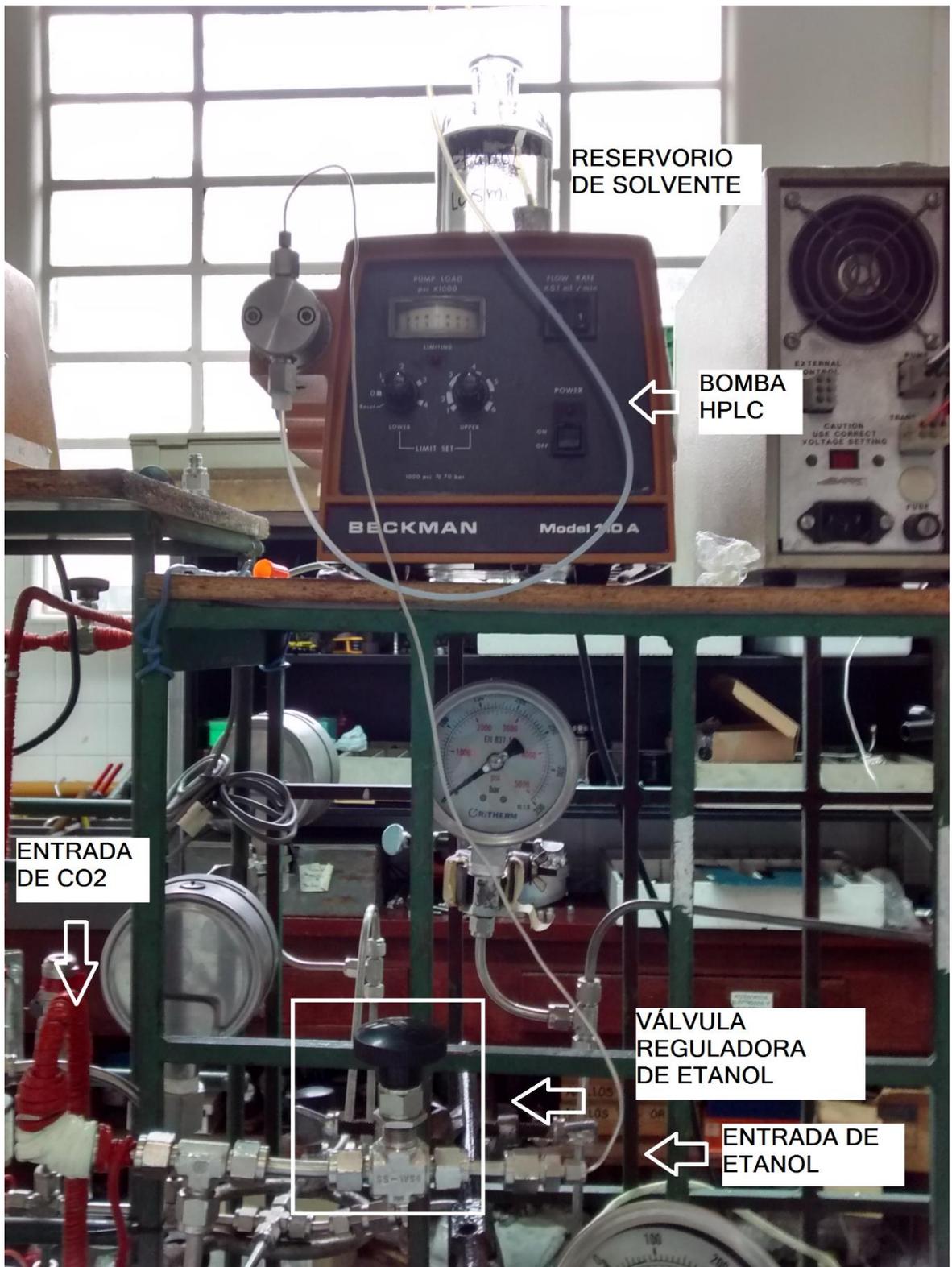


Figura 14. Detalle de la conexión de la bomba HPLC al extractor. .

El equipo que se armó (Figura 12) consta de una celda de extracción elaborada en acero inoxidable 316 de 16 mL de capacidad, recubierta con una chaqueta de calentamiento eléctrico, la cual se encuentra conectada a un controlador de temperatura tipo PID, utilizando como indicador de temperatura un termopar tipo J. Cuenta con una entrada para CO₂ y otra para el co-solvente, el cual es impulsado por medio de una bomba HPLC Beckman modelo 140A, que soporta flujos de 0,0-9,9 mL/min (Figura 13 y 14). El CO₂ se presuriza por medio de una bomba tipo pistón, conectada a un regulador de frecuencia. La tubería es de acero inoxidable 316 de 1/8” de diámetro. Para evitar la formación de nieve carbónica al momento de descargar el batch y despresurizar el CO₂ la tubería se calienta empleando una resistencia de alambre Kanthal recubierto. Ésta se conecta a un controlador de temperatura tipo PID, utilizando como indicador de temperatura un termopar tipo J.

En la zona de descarga se instaló una válvula BPR (Regulador de caída de presión) con el fin de regular la descarga del extracto a la presión de ensayo. Dado que el caudal de descarga del CO₂ puede arrastrar extracto, se instalaron dos recipientes de colección en serie.

5.4.3.2. Variables y Diseño Factorial

Se realizaron ensayos preliminares para determinar si era posible extraer analitos de interés de acuerdo a un diseño experimental. El diseño experimental No. 1 fue de tipo factorial compuesto 2², con cuatro puntos estrella y cinco puntos centrales. La presión se variaría entre 130-272 bar y la temperatura entre 36-56°C, teniendo como límites las condiciones supercríticas del CO₂ y los límites del equipo, utilizando únicamente CO₂ supercrítico (Figura 15).

Posteriormente, se planteó otro diseño experimental (No. 2) (Figura 16) para observar el efecto de la adición de etanol al 96% como co-solvente. Con el objetivo de mantener el estudio del efecto de dos variables se trazó un diseño de tipo factorial compuesto 2², manteniendo la temperatura constante (60°C), basado en recomendaciones de la literatura (Asep & otros, 2013; Teng-ju & otros, 2008; Salajegheh & otros, 2013). Se varió el porcentaje de co-solvente (10-20%) y la presión de la vasija de extracción (150-250°C), obteniendo un total de 13 puntos experimentales. En la Tabla 7 se muestra el diseño experimental empleado para la extracción.

Tabla 7. Descripción del diseño experimental establecido

Punto	Presión bar	Cosolvente % p/p
1	150,0	20,0
2	200,0	7,9
3	150,0	10,0
4	270,7	15,0
5	200,0	15,0
6	250,0	20,0
7	200,0	15,0
8	129,3	15,0
9	200,0	22,1
10	200,0	15,0
11	200,0	15,0
12	250,0	10,0
13	200,0	15,0

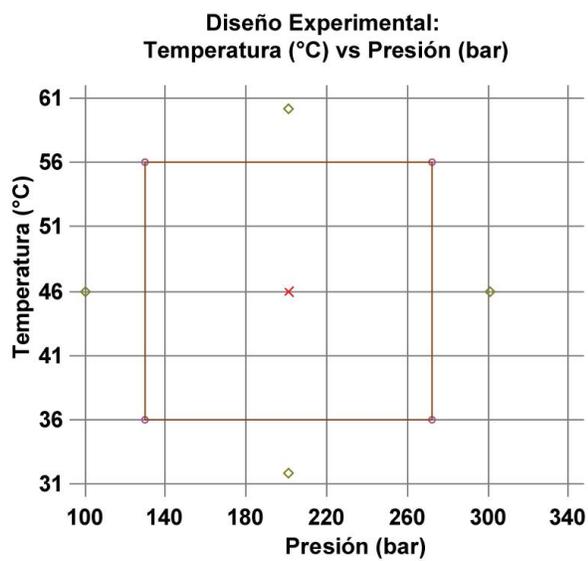


Figura 15. Diseño experimental 1. Temperatura (°C) - Presión (bar).

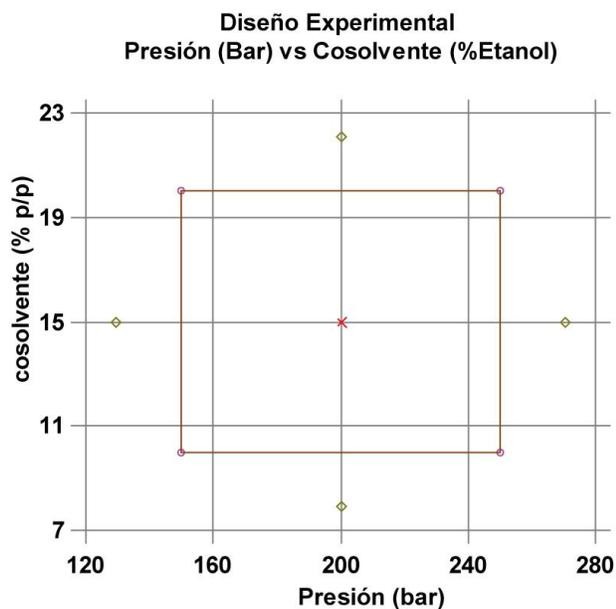


Figura 16. Diseño experimental 1. Cosolvente (%) - Presión (bar).

5.4.3.3. Curva de extracción supercrítica

Para la determinación del tiempo óptimo de extracción se realizó una extracción exhaustiva durante siete horas a las menores condiciones de extracción para ambos diseños experimentales planteados, para lo cual se realizó la extracción tipo batch fijando en 10 minutos de extracción cada lote, con el objetivo de agotar la muestra y establecer cuántos lotes eran necesarios para obtener un comportamiento asintótico en la curva o para que la diferencia entre los rendimientos acumulados entre un lote y otro fuera inferior al 5%.

5.4.4. Determinación del Contenido Total de Fenoles (CTF)

Esta prueba se hizo tanto para los extractos soxhlet como para los supercríticos. Se realizó por el método Folin-Ciocalteu (F-C), usando el ácido gálico (A.G.) como estándar a partir de una solución stock de ácido gálico extra-puro (Merck) a 1 mg/mL. Se mezcló 100 μ L de solución estándar o de extracto a 2 mg/mL y 750 μ L de reactivo de Folin–Ciocalteu (Merck) al 10% en agua desionizada, se agitó y dejó en reposo 5 minutos en oscuridad. Luego se adicionaron 750 μ L de una solución al 6% de Na_2CO_3 anhidro (JT Baker). Se agitó nuevamente y se dejó 90 minutos reaccionando en oscuridad. La absorbancia del color azul

fue medida a 765 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo-Scientific Genesys 10 contra una muestra de blanco que contenía metanol, reactivo de Folin y Carbonato de Sodio en las cantidades anteriormente mencionadas. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico (Tabla 8). El contenido total de fenoles es expresado como miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra de material seco (mg-eq GA/g cascarilla). Todas las mediciones se hicieron por triplicado (Carrillo & otros, 2014; Arlorio & otros, Characterization of pectins and some secondary compounds from Theobroma cacao hulls, 2001).

Tabla 8. Diluciones para realizar la curva de calibración con Ácido Gálico. .

	V sln stock[mL] (V1)	V MeOH [mL]	C2 [mg/mL]
Blanco	0,000	1,000	0,000
1	0,020	0,980	0,020
2	0,040	0,960	0,040
3	0,060	0,940	0,060
4	0,080	0,920	0,080
5	0,100	0,900	0,100
6	0,120	0,880	0,120
7	0,140	0,860	0,140

5.4.5. Ensayo de Actividad Antioxidante (AA)

Se realizaron dos ensayos: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) que mide la capacidad de atrapar radicales libres (Espinal, Olaya, Restrepo, Silva, & Parada, 2010) y que se realizó a modo de tamizaje para realizar la evaluación de la protección contra la oxidación lipídica de aceite vegetal comestible sobre los extractos más activos tanto de soxhlet como de extracción supercrítica.

5.4.5.1. Ensayo de captación de radicales libres de DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidracil).

Para este ensayo se adicionaron 25 μ L de extracto a 2 mg/mL en metanol o del estándar y 975 μ L de una solución 0,1 mM de 2,2 difenil-1-picrilhidracilo (Aldrich) que se preparó con anterioridad en metanol (Panreac). Como referencia se usó la misma cantidad de DPPH y 25 μ L del solvente (metanol). El blanco utilizado fue metanol. Las mezclas se agitaron vigorosamente y se dejaron reaccionar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 min. La absorbancia se registró a 517 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo-Scientific

Genesys 10. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición, siguiendo la fórmula 21 y como valores TEAC (μmol de trolox/g de cascarilla) mediante la construcción de una curva patrón usando varias concentraciones del antioxidante Trolox® (Tabla 9). (Zapata-Bustamante & otros, 2013).

$$\%I = \frac{Abs_{t=0} - Abs_{t=30}}{Abs_{t=0}} * 100 \quad (21)$$

Tabla 9. Datos para realizar curva de calibración con Trolox. .

	V1 [mL] de sln stock de Trolox	V MeOH [mL]	C2 [mM]
DPPH sin antioxidante	0	1	0
1	0,025	0,975	0,013
2	0,050	0,950	0,025
3	0,200	0,800	0,100
4	0,250	0,750	0,125
5	0,350	0,650	0,175
6	0,650	0,350	0,325

5.4.5.2. Ensayo de oxidación de aceite vegetal comestible

Para este ensayo se utilizó un aceite vegetal comestible tipo mezcla, altamente consumido en los hogares colombianos, según la empresa Team Foods, quien proveyó la muestra. El aceite utilizado contiene una mezcla mayoritariamente de aceite de soya, compuesta principalmente ácido linoleico (omega 6) y oleico (Lafont, 2014); y en menor proporción oleína de palma, constituida principalmente por ácido palmítico y oleico (Martínez Ávila & otros, 2007).

Se siguió el procedimiento de (Nourooz-Zadeb & otros, 1995) con modificaciones. Inicialmente, se reconstituyeron los extractos más activos obtenidos tanto en soxhlet como en extracción supercrítica a 8 mg/mL en metanol (Panreac). Se agitaron en vortex y de ser necesario, para su disolución total, en baño ultrasónico. Se prepararon las soluciones de los patrones: el antioxidante sintético, terbutilhidroxiquinona -TBHQ (TCI- Tokyo Kasei) y el antioxidante de referencia, ácido gálico extra-puro (Merck) a 8 mg/mL en metanol, almacenándolos en oscuridad a -20°C hasta su momento de uso. Posteriormente, se pesaron aproximadamente 20 g de aceite por cada frasco ámbar. Luego, se adicionó 500 μL de

extracto o patrón, con el fin de que la concentración de antioxidantes fuera de 200 mg extracto/kg aceite, de acuerdo a lo exigido en el código alimentarius para grasas y aceites, así como en las resoluciones 4124 de 1991 y en el proyecto de resolución de 2012 del Ministerio de Salud y el Ministerio de Protección Social de Colombia (GSFA , 2014; Ministerio de Salud de Colombia, 1991; Ministerio de la Protección Social de Colombia, 2012). Finalmente se adicionó el $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, el acelerador de la oxidación con el fin de obtener una concentración de 3.5 ppm de hierro (Fe^{2+}) en aceite. El montaje se realizó con cada uno de los extractos obtenidos, los patrones y el control positivo de oxidación. Este último, es aceite al cual se le adicionó 500 μL de metanol (solvente en el cual se reconstituyeron los extractos) sin ningún tipo de extracto, con sus respectivos triplicados. Se le aplicó un burbujeo de aire cada 3 horas por 5 minutos, cuatro veces al día, durante 6 días, utilizando para ello un motor de aire para pecera y temperatura constante de 70°C (para montaje ver Figura 17), con el fin de inducir y acelerar el proceso de peroxidación de los ácidos grasos presentes en el aceite (Figura 7). Cada 48 horas se tomó una muestra de aceite y se midió la cinética de oxidación por medio de cuantificación de hidroperóxidos totales (HPT) y el ensayo de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), haciendo así mismo una medición al día cero de oxidación, igual para todas las muestras.

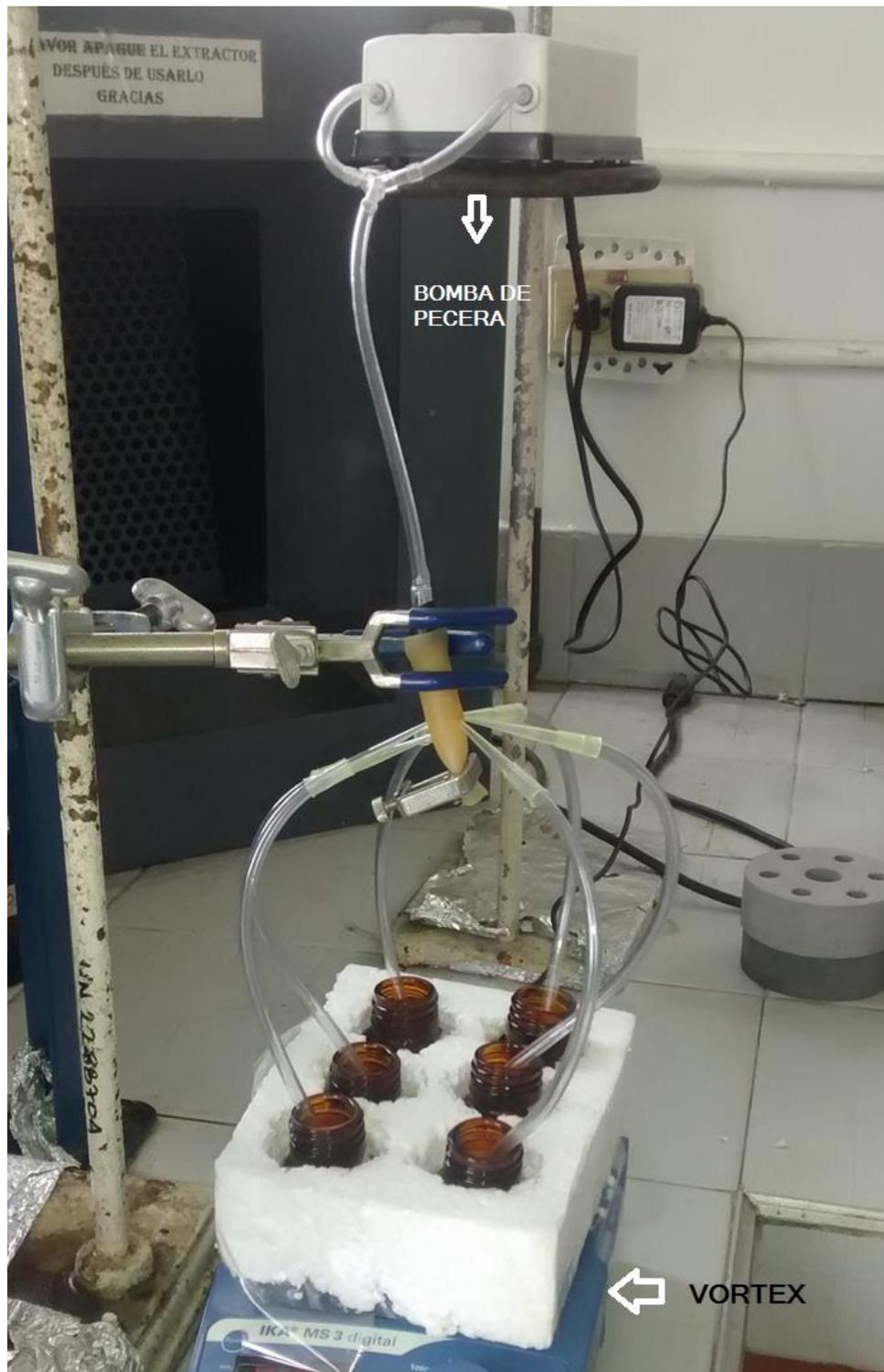


Figura 17. Montaje de burbujeo de aire del ensayo de oxidación de aceite. .

- **Cuantificación de hidroperóxidos**

Se tomó una muestra de 50 mg de aceite contenido en cada frasco ámbar, a la cual se le adicionó 500 μL de isoctano puro (Panreac). Se agitó en vortex por 30 segundos, se tomó una alícuota de 20 μL de esta solución, se transvasó a un tubo falcon y se le adicionó 2 mL de iso-octano. La curva de calibración se hizo con ácido linoleico y fue construida con base a la ley de Lambert-Beer, teniendo como dato el coeficiente de extinción molar (ϵ) de este ácido graso, el cual es de $24500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (ver Anexo B). Se leyó la absorbancia a 234 nm, donde se registra la absorción máxima del ácido linoleico (cis-trans), utilizando como blanco isoctano (Arenas Sosa & López Sánchez, 2004). Los resultados se expresaron en mmol de ácido linoleico/kg aceite.

- **Especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)**

Se tomó una muestra de 50 mg de aceite contenido en cada frasco ámbar y se colocó en tubos falcon. Se le adicionó 25 μL de TBHQ (TCI- Tokyo Kasei) a 5000 ppm para detener la oxidación. Luego se le adicionó 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) para análisis (Panreac) 0,3M en una solución 0,2N de HCl (Panreac). Se agitó en vortex por 3 minutos y se le adicionó 0,75 mL de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) para análisis (Panreac) 26 mM. Se agitó la mezcla por 2 minutos y se colocó en baño de agua hirviente a 85°C por 40 minutos. Pasado este tiempo se colocaron inmediatamente en baño de hielo para detener la reacción, se tomó una alícuota de 3 mL y se pasó a otro falcon. Se adicionaron 3 mL de diclorometano (Merck) y se agitó en vortex por 1 minuto. Luego, se centrifugó el contenido durante 5 minutos a 5000 RPM y 20°C . Se tomó con micropipeta el sobrenadante y se transvasó a la celda de cuarzo. La absorbancia se midió a 532 nm, utilizando como blanco el TBHQ, el TBA y el TCA en las cantidades anteriormente mencionadas, sometiéndolo al mismo procedimiento. La curva de calibración se realizó con 1,1,3,3 tetraetoxipropano (TEP). Para la construcción de ésta se mezcló 73,2 mg de reactivo de TEP (Sigma) con 10 mL de HCl 0,1 N (Figura 18) en un tubo de ensayo con tapa rosca. Se llevó a baño de agua hirviente por 5 minutos y se enfrió en baño de hielo. Luego se preparó una solución stock con el TEP hidrolizado y se hicieron distintas diluciones con agua miliQ. De cada una de estas diluciones se tomaron muestras de

aproximadamente 50 mg, luego se repitió el mismo proceso para TBARS, leyendo absorbancia a 532 nm. Los resultados se expresaron en mmol MDA/ kg aceite.

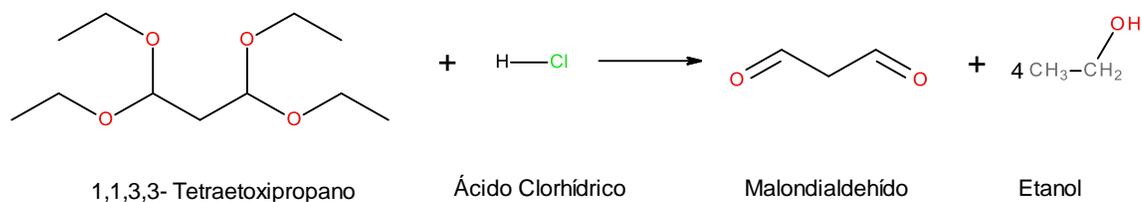


Figura 18. Reacción del TEP con el HCl. Fuente: autores.

5.4.6. Metodología para la comparación de resultados

Los resultados obtenidos de CTF fueron comparados con los realizados en cáscara de la semilla (Bruna & otros, 2009; Martínez, y otros, 2012; Arlorio, y otros, 2005), en la semilla (Carrillo & otros, 2014) y otras biomásas procedentes de la industria vinífera (Da Porto & Decorti, 2014) y del té verde (Molan, De, & Meagher, 2009), debido a que estas dos últimas biomásas son reconocidas por su alto contenido en polifenoles (Zumbé, 1998).

5.4.7. Metodología para análisis estadístico

Los resultados de rendimiento, porcentajes de inhibición de la oxidación por DPPH y el CTF son expresados como promedios \pm DE (desviación estándar) para $n=3$. Promedios con letras diferentes fueron significativamente diferentes en el nivel de $p<0,05$ según la prueba de Tukey, utilizando el *software* R Project.

La correlación existente entre la actividad antioxidante y el CTF fue analizada utilizando la prueba del coeficiente de correlación a partir de un análisis de varianza ANOVA (Martínez, y otros, 2012). Adicionalmente, respecto a la extracción con fluidos supercríticos, se realizó un ANOVA multifactorial para determinar el efecto de las variables de entrada sobre las variables de respuesta y se realizó un análisis de correlación entre las mismas. Del mismo modo se utilizó un análisis de superficie de respuesta para escoger los extractos más activos del diseño experimental supercrítico, por lo cual se ajustaron los datos a un modelo estadístico, maximizando rendimiento total y CTF, empleando el *software* Statgraphics Centurion XVI.

5.4.8. Metodología para la evaluación Económica

El diseño conceptual del proceso de extracción para la simulación, se basó en la similitud del utilizado a escala laboratorio y es mostrado en la Figura 19. Las especificaciones técnicas de los equipos se encuentran en la sección de anexos y los costos de materia prima fueron tomados del trabajo de Moncada Botero, (2012) .

Con el fin de simular una planta piloto se escogió un volumen de 5 L para la vasija de extracción. Con base a esto, se recalculó la masa de CO₂ y de etanol necesarios para obtener la proporción adecuada de fluido supercrítico y co-solvente, así como la nueva capacidad de la vasija, teniendo en cuenta que para la vasija a nivel laboratorio de aproximadamente 16 mL de capacidad era posible aglomerar 20 g de muestra, obteniendo un total de 6.250 kg a procesar por día. Teniendo en cuenta que cada extracción tuvo una duración de 4 horas y que cada batch tuvo una duración efectiva a nivel laboratorio de 15 min (incluyendo tiempo de carga y descarga), el tiempo de extracción total es de 5 h y 15 min. Por lo tanto, se simuló la realización de 3 extracciones por día.

El modelo termodinámico seleccionado para la simulación del proceso fue UNIQUAC–SRK el cual permitió modelar las condiciones críticas del dióxido de carbono y en general el etanol y el agua. Por otra parte, el *software* Aspen Hysys no tiene un módulo de lixiviación, por lo que fue necesario simular el proceso de separación del CO₂ del extracto a modo de un separador flash. El paquete termodinámico seleccionado permitió simular compuestos polares (agua), medianamente polares (compuestos fenólicos) y no polares (dióxido de carbono). La ecuación de estado SRK puede usarse para hidrocarburos y gases livianos a presión atmosférica o superior. Los valores obtenidos para distintas propiedades son razonablemente precisos para su uso ingenieril, por lo que tiene aceptación en este campo sin embargo su aplicación está limitada a compuestos no polares o levemente polares. Por lo que para el manejo de mezclas se utilizó el modelo de coeficientes de interacción UNIQUAC el cual utiliza valores experimentales y basado en la contribución de grupos y se convierte en una alternativa para cuando la información experimental es escasa (Galen, 2014).

Se realizó la simulación del proceso, requiriendo un compresor de tipo reciprocante para el CO₂ con el fin de alcanzar la presión de operación y una bomba centrífuga para impulsar el

etanol. Estas dos corrientes se unen en un punto de mezcla. Seguido, ésta se somete a un precalentamiento a través de un intercambiador para alcanzar la temperatura deseada. Posteriormente, la mezcla pasa a un extractor donde la transferencia de masa toma lugar y es posible realizar una extracción sólido líquido, que al descargarse se descomprime, saliendo el CO₂ en forma de gas y el etanol con el extracto fenólico.

Considerando que la composición del extracto en medio del etanol es lo suficientemente pequeña, se consideró que el proceso podría estimarse a partir de la termodinámica de los componentes que son lo suficientemente reconocidos por el *software*, al final del proceso se utilizó una operación especial brindada por Aspen que permite transformar un flujo a otro, manteniendo las mismas condiciones de operación. Las condiciones utilizadas para el sistema de extracción fueron las tomadas del mejor extracto comparado con el punto óptimo obtenido por el método de superficie de respuesta. La Figura 19 presenta el esquema de la simulación del proceso empleado.

Se realizó una evaluación económica para una planta piloto, con un volumen fijo de extracción, teniendo en cuenta la productividad (kg/año), costos de operación (US\$/año), discriminados en: costo de manufactura (US\$/kg extracto), costo de materia prima (%), costo de mano de obra (%), costo de inversión (%), costo de control de calidad (%), costo de servicios públicos (%), imprevistos (%), teniendo como variable de respuesta el tiempo de retorno de la inversión en años haciendo uso del *software* ASPEN Plus v11.0. (Prado, y otros, 2012).

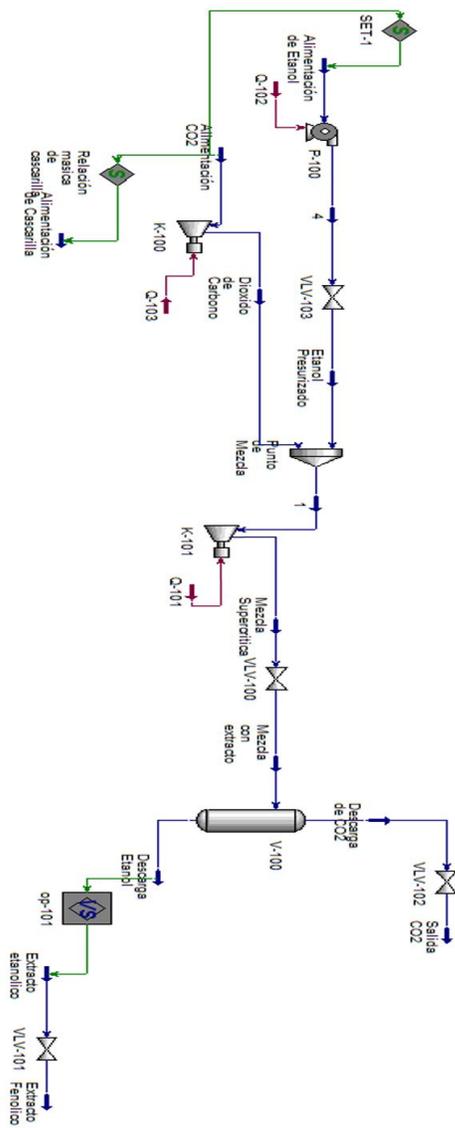


Figura 19. Esquema de simulación del proceso de extracción de antioxidantes utilizando CO₂ supercrítico.

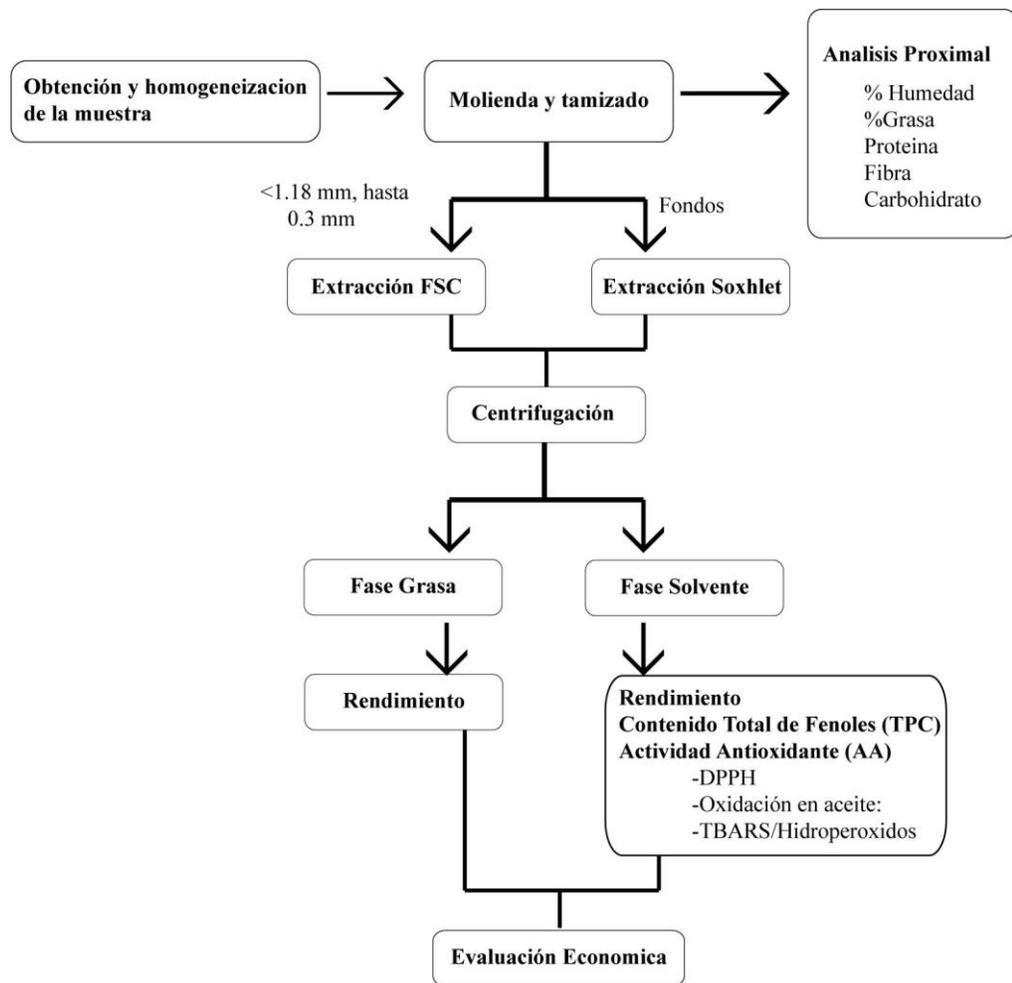


Figura 20. Esquema general de la metodología experimental.

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1. Caracterización de la muestra: Análisis Proximal

En la Tabla 10 se observan los resultados obtenidos para la caracterización de la muestra.

Tabla 10. Comparación entre caracterización del cacao colombiano y caracterización de cacao español (Barcelona Patente n° ES2099676, 1997) y cacao italiano (Arlorio, y otros, 2005).

	Promedio ± DE	Patente (Rius,1997)	Arlorio y otros, 2005
Humedad [%]	4,8 ± 0,0	4,60	10,12 ± 0,6
Grasa [%]	3,4 ± 0,1	2,20	6,81 ± 0,25
Proteína [%]	20,6 ± 0,8	14,90 ± 2	18,12 ± 0,81
Fibra [%]	55,6 ± 0,7	43,50 ± 5	60,6 ± 0,64
Cenizas [%]	10,6 ± 0,1	13,50 ± 1	8,1 ± 0,39
Compuestos polifenólicos Método F-C [mg-eq AG/g cascarilla]	2,399 ± 0,115*	7 ± 1,5 **	1,82 ± 0,84

*Tomados del extracto con mayor cantidad de fenoles (EtOH)

**No se especifica el método de obtención

Se observa que las características mostradas en el análisis proximal (Tabla 10), en general, no difieren entre cáscaras de semillas de cacao de diferentes regiones. Sin embargo, otros estudios presentan diferencias significativas respecto al CTF. De acuerdo a la Figura 21, existe una variación de acuerdo a la ubicación geográfica, ubicándose la cáscara de la semilla de cacao colombiano entre los valores más bajos y a su vez es parecido a los obtenidos en las regiones vecinas de Venezuela y Ecuador. Este resultado puede explicarse por la genética de las semillas de cacao, que pueden ser similares en las regiones anteriormente mencionadas o que las condiciones ambientales y de suelos son similares.

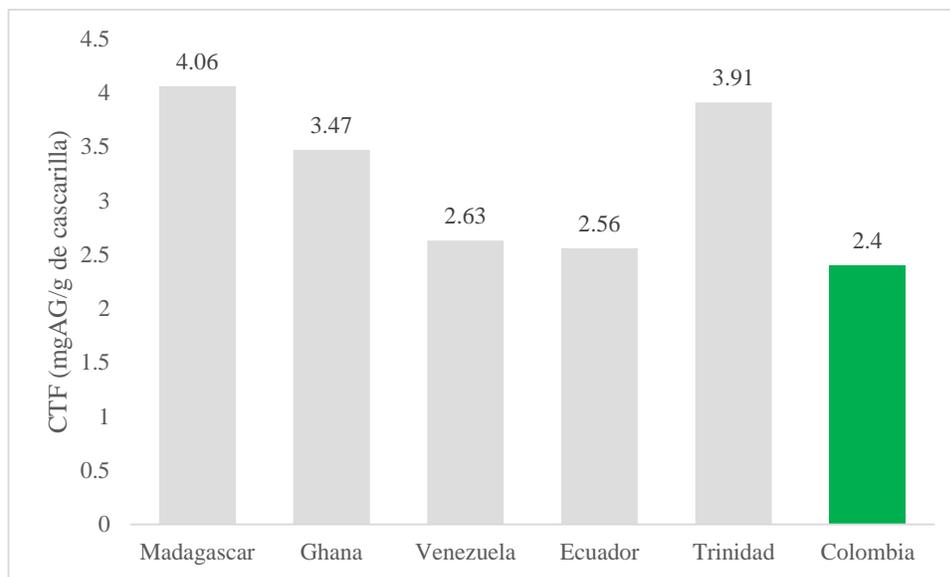


Figura 21. Contenido de fenoles totales de extractos de cáscaras de semillas de cacao de diferentes orígenes. Tomado de (Bruna & otros, 2009).

6.2. Extracción Soxhlet a presión reducida

6.2.1. Rendimientos

Las Figuras 22-24 muestran los promedios de rendimiento, donde las barras de error representan la desviación estándar para tres experimentos. Promedios con letras diferentes fueron significativamente diferentes en el nivel de $p < 0,05$ según la prueba de Tukey,

Convenciones:

- **Bencina:** Biomasa tratada con bencina.
- **Ben-AcOEt:** Biomasa tratada con acetato de etilo, previamente desengrasada con bencina.
- **Ben-AcOEt-EtOH:** Biomasa tratada con etanol, previamente tratada con acetato de etilo y bencina.
- **AcOEt:** Biomasa tratada con acetato de etilo.
- **AcOEt- EtOH:** Biomasa tratada con etanol, previamente tratada con acetato de etilo.
- **EtOH:** Biomasa tratada con etanol.

En la Figura 22 se observa que los extractos con mayor rendimiento de la fase solvente fueron EtOH y Bencina, mientras que en el rendimiento de grasa (Figura 23) este último se encuentra

entre los menores y el extracto EtOH posee el mayor rendimiento. Esto se explica debido a que el solvente bencina (de baja polaridad) solubiliza en su mayoría la grasa, por lo que su cantidad precipitada en la centrifugación será mínima y el rendimiento de la fase solvente será máximo (Figura 22), mientras que el extracto EtOH precipitó mayor cantidad de grasa en el centrifugado, sin embargo presentó un alto rendimiento en la fase solvente por su afinidad con compuestos de mayor polaridad, al parecer presentes también en alta cantidad en la biomasa. También se observó una disminución progresiva respecto al rendimiento total (rendimiento fase grasa + rendimiento fase solvente) (Figura 24) de los extractos Bencina, Ben-AcOEt y Ben-AcOEt-EtOH, debido al agotamiento de la muestra en las extracciones sucesivas. Se observa que el porcentaje de grasa extraída con bencina es mayor que la indicada por el análisis proximal. Esto se debe principalmente a que la metodología utilizada en la caracterización no es tan intensiva (4 hr) como lo fue la extracción soxhet (7 hr) por lo que los fenómenos de transferencia de masa durante un mayor tiempo incrementaron la cantidad posible a extraer.

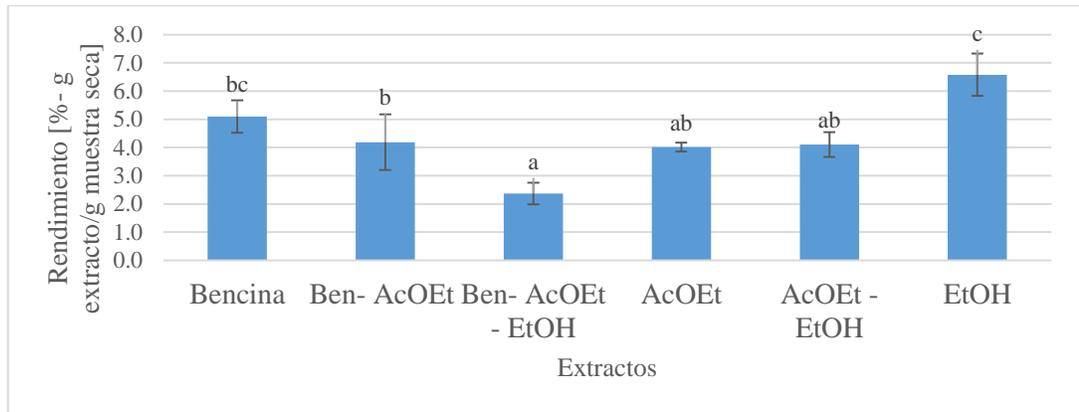


Figura 22. Rendimientos de extracción soxhlet de la fase solvente con análisis Tukey.

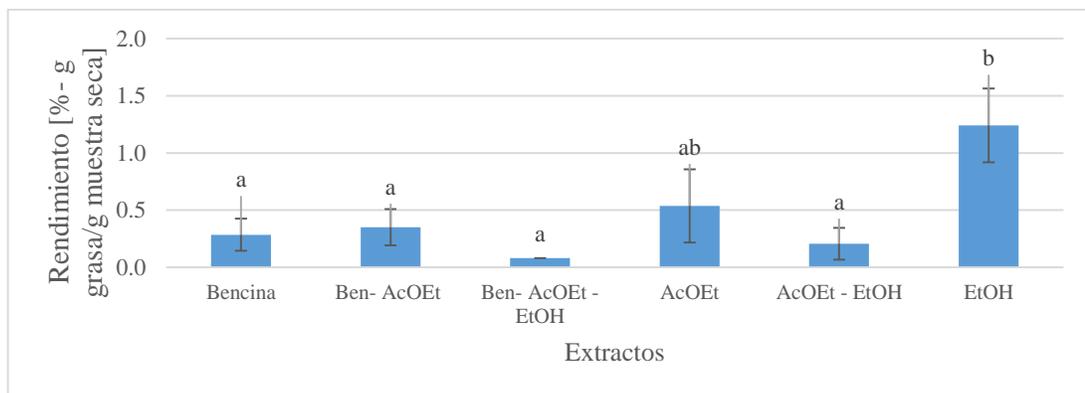


Figura 23. Rendimientos de extracción soxhlet de la fase grasa con análisis Tukey.

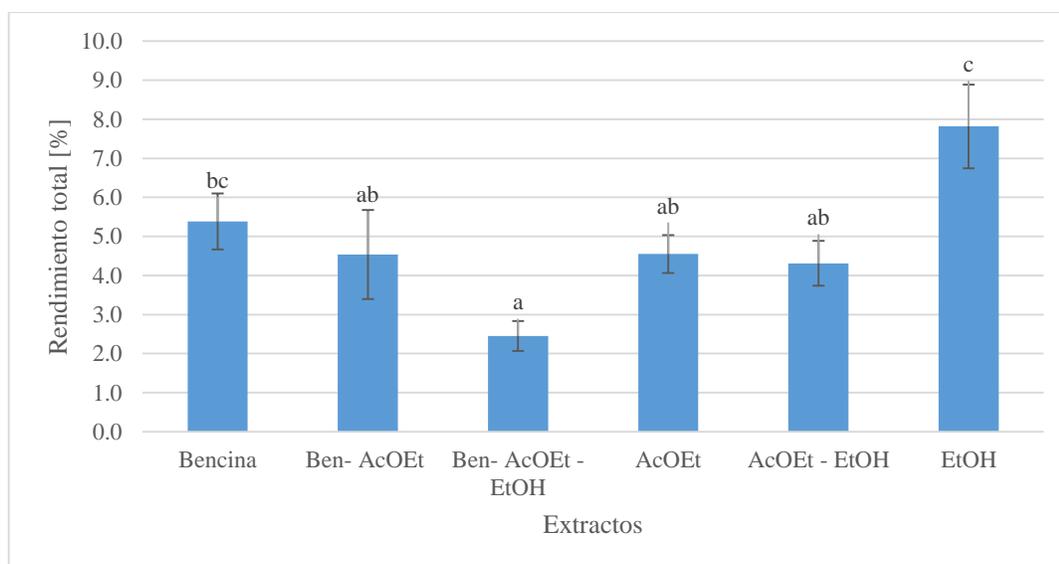


Figura 24. Rendimientos totales de la extracción soxhlet con análisis Tukey.

La Tabla 11 muestra los datos correspondientes a las figuras 22-24.

Tabla 11. Porcentajes de rendimiento y desviación estándar (DE) de la extracción soxhlet con análisis Tukey. .

Extractos	Solvente	Grasa	Total
	Rendimiento [%]		
Bencina	5,1 ± 0,6	0,3 ± 0,1	5,4 ± 0,7
Ben- AcOEt	4,2 ± 1,0	0,4 ± 0,2	4,5 ± 1,1
Ben- AcOEt - EtOH	2,4 ± 0,4	0,1 ± 0,0	2,5 ± 0,4
AcOEt	4,0 ± 0,2	0,5 ± 0,3	4,6 ± 0,5
AcOEt - EtOH	4,1 ± 0,4	0,2 ± 0,1	4,3 ± 0,6
EtOH	6,6 ± 0,7	1,2 ± 0,3	7,8 ± 1,1

6.2.2. Contenido Total de Fenoles

En las Figuras 25 y 26 se presenta el CTF de los extractos soxhlet (Tabla 12). Se observa un comportamiento distinto del contenido total de polifenoles (Figura 25) respecto al que presentó el rendimiento (Figura 22). El extracto con mayor cantidad de polifenoles es AcOEt-EtOH expresado en mg-eq AG/g extracto, seguido por EtOH y Ben-AcOEt-EtOH, es decir, los extractos etanólicos, lo que indica que los polifenoles presentes en la biomasa presentaron mayor afinidad por el etanol. La cantidad de polifenoles se modifica al expresarlo por gramo de muestra, esto debido al efecto del rendimiento (Figura 26). Lo que indica, nuevamente, que el solvente más selectivo es el más polar.

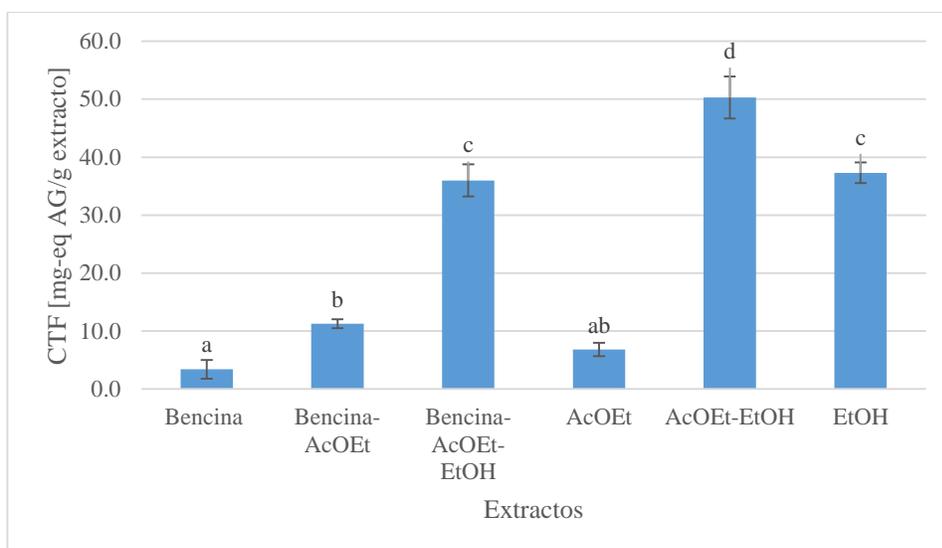


Figura 25. CTF de los extractos soxhlet expresados en mg-eq de AG/g de extracto con análisis Tukey.

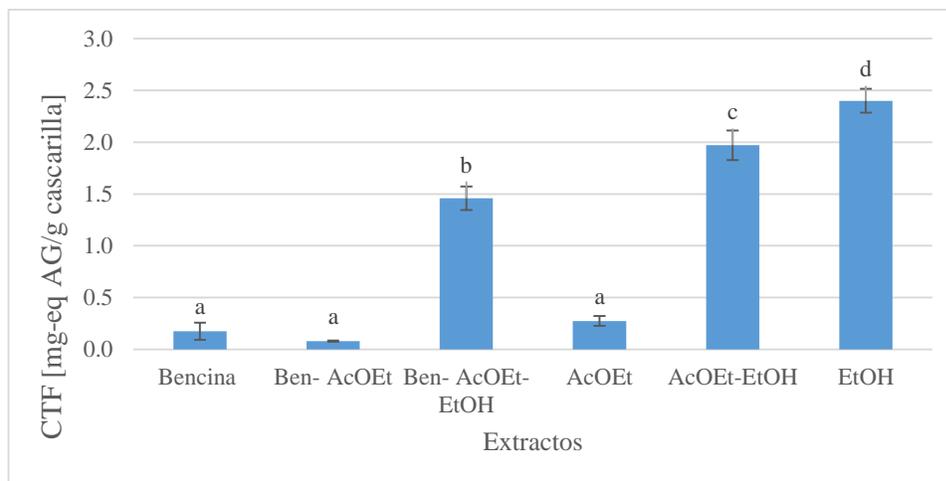


Figura 26. CTF de los extractos soxhlet expresado en mg-eq de AG/g de cascarilla seca con análisis Tukey.

Tabla 12. Tabla de datos para el contenido total de fenoles de extractos soxhlet. .

Extractos	[mg eq AG/g extracto	mg eq AG/ g cascarilla
Bencina	3,411 ± 1,610	0,175 ± 0,082
Ben- AcOEt	11,281 ± 0,788	0,079 ± 0,005
Ben- AcOEt- EtOH	35,996 ± 2,791	1,459 ± 0,113
AcOEt	6,809 ± 1,160	0,273 ± 0,047
AcOEt-EtOH	50,276 ± 3,627	1,971 ± 0,142
EtOH	37,307 ± 1,795	2,399 ± 0,115

6.2.3. Actividad antioxidante por captación de radical DPPH

Se comparó el porcentaje de inhibición a la oxidación de los extractos con los patrones (Tabla 13), reduciendo estos últimos en su mayoría el radical, mientras que en los extractos con mayor actividad antioxidante fueron AcOEt-EtOH, EtOH y Ben-AcOEt-EtOH (Figura 27 y 28), lo cual coincide con lo observado para el CTF (Figura 25).

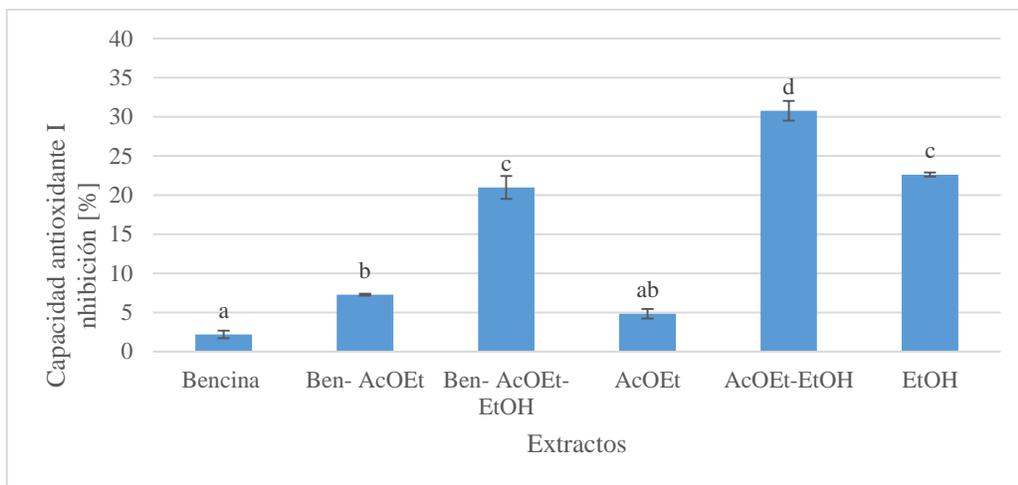


Figura 27. Actividad antioxidante de extractos soxhlet expresada en porcentaje de inhibición de la oxidación con análisis Tukey.

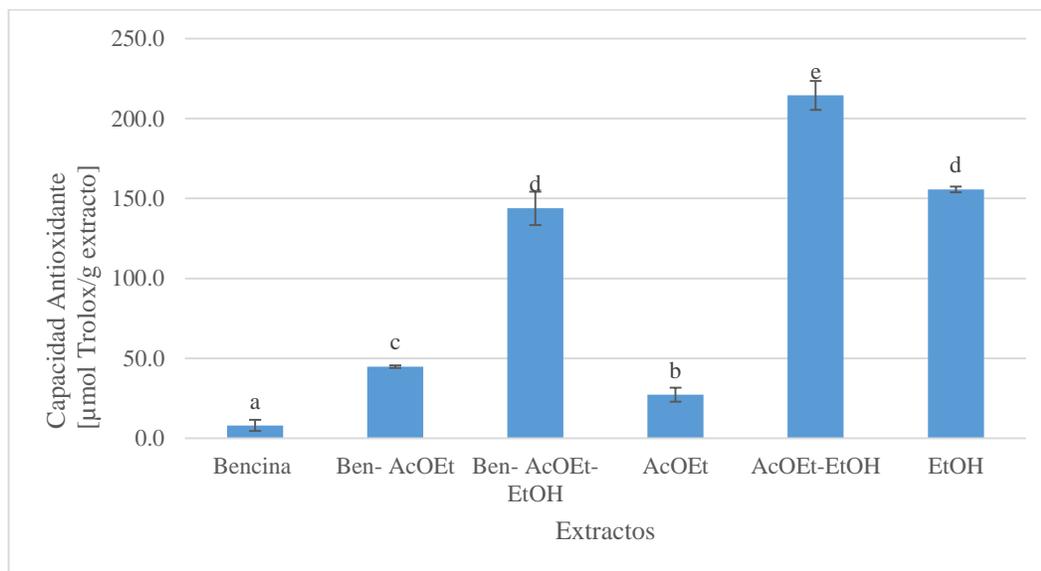


Figura 28. Actividad antioxidante de extractos soxhlet expresada en μmol de Trolox/g extracto con análisis Tukey.

En la Figura 29 se observa el efecto del rendimiento sobre la actividad antioxidante, siendo los extractos etanólicos los que poseen mayor actividad antioxidante expresado en μmol de Trolox/g cascarilla.

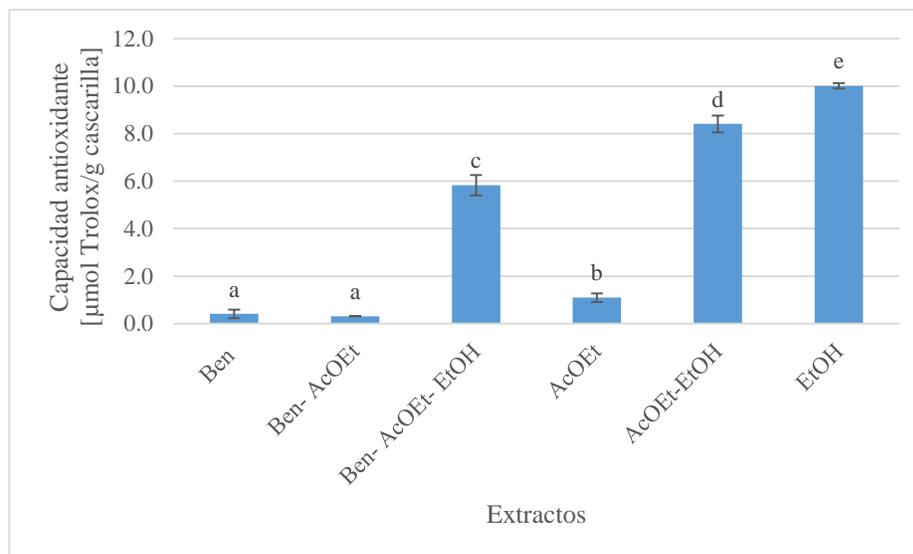


Figura 29. Actividad antioxidante de extractos soxhlet expresada en μmol de Trolox/g cascarilla seca con análisis Tukey.

Tabla 13. Datos para la actividad antioxidante de los extractos Soxhlet.

Extractos	% inhibición	μmol Trolox/g extracto	μmol Trolox/g cascarilla
Bencina	$2,2 \pm 0,5$	$7,983 \pm 3,431$	$0,408 \pm 0,176$
Ben- AcOEt	$7,3 \pm 0,1$	$44,748 \pm 0,858$	$0,312 \pm 0,006$
Ben- AcOEt- EtOH	$21,0 \pm 1,5$	$143,838 \pm 10,481$	$5,831 \pm 0,425$
AcOEt	$4,8 \pm 0,6$	$27,241 \pm 4,401$	$1,094 \pm 0,177$
AcOEt-EtOH	$30,8 \pm 1,3$	$214,566 \pm 9,090$	$8,411 \pm 0,356$
EtOH	$22,6 \pm 0,2$	$155,742 \pm 1,785$	$10,016 \pm 0,115$
TBHQ	$96,7 \pm 0,1$		
AG	$96,3 \pm 0,2$		

6.2.4. Correlación de TPC y AA en los extractos Soxhlet

Los resultados mostrados en la Figura 30 indican que existe una relación lineal entre actividad antioxidante y el CTF, lo que indica que probablemente los polifenoles cuantificados mediante el método de Folin Ciocalteu fueron los responsables de inhibir la oxidación. Estos resultados fueron acorde a los obtenidos por (Azizah & otros, 2007) y (Padilla, 2008) quiere decir que a mayor cantidad de polifenoles mayor será su acción para inhibir la oxidación. Esto se debe a la acción que ejercen sobre el rompimiento de la reacción

en cadena de los radicales libres por donación de un átomo de hidrogeno libre. De esto se deduce la capacidad reductora que pueden tener los compuestos extraídos. Hay que resaltar que la selectividad durante el proceso de extracción supercrítica varió el tipo de compuestos extraídos, por consiguiente las estructuras químicas de los polifenoles son posiblemente distintas en cada extracto, esta es una razón que explica la diferencia entre las actividades antioxidantes de cada uno.

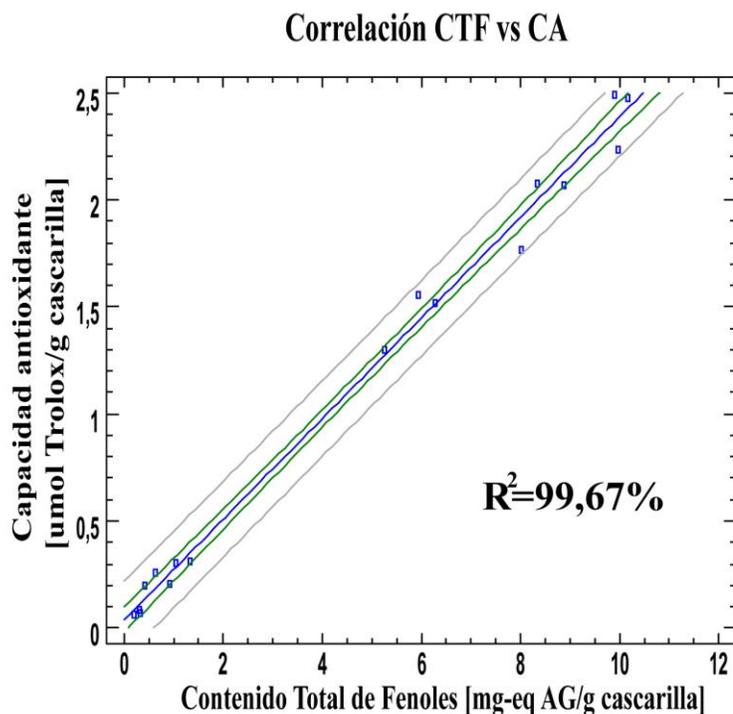


Figura 30. Correlación entre CTF y CA. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

6.3. Extracción con CO₂ supercrítico

6.3.1. Diseño experimental n.º 1

Al realizar un ensayo preliminar utilizando el primer diseño experimental (CO₂ supercrítico) para las menores condiciones de extracción se obtuvo un rendimiento nulo, por lo que se empleó un segundo diseño experimental (CO₂ supercrítico con etanol al 96% como cosolvente). De acuerdo a esto se concluye que el CO₂ por sí solo no es útil para extraer los analitos de interés a condiciones planteadas. Por ello se hizo necesario adoptar otro diseño

experimental, considerando el efecto del co-solvente y reemplazando la variable de temperatura por un valor fijo.

6.3.2. Curva de extracción

Se realizó la curva de extracción a 60°C y a las condiciones más bajas del diseño experimental 2 (Figura 18): 10% de etanol y 150 bar, con el fin de optimizar el tiempo de extracción. La Figura 31 muestra la curva de extracción, alcanzando un rendimiento de 6,51%, el cual es cercano a los mejores obtenidos por extracción soxhlet. Se observó que desde el lote 19 no hubo aumento significativo en el rendimiento acumulado, debido a la disminución del gradiente de concentración entre la matriz vegetal y el solvente, lo indicó un acercamiento al equilibrio, disminuyendo la velocidad de transferencia de masa. Con base a esto, se escogen 20 lotes como los necesarios para agotar la muestra.

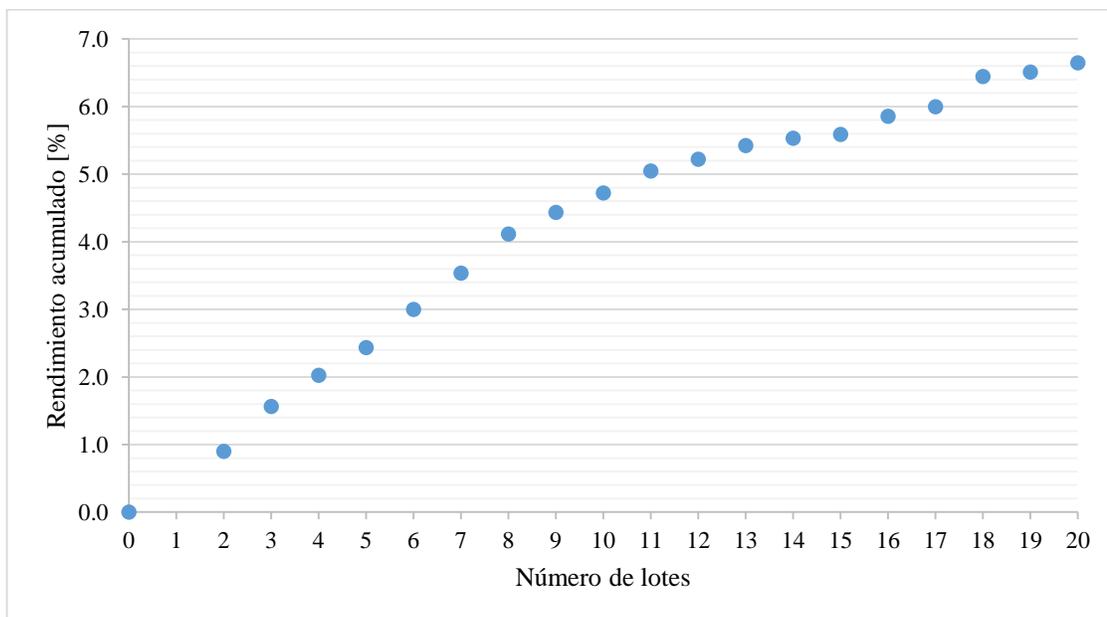


Figura 31. Curva para optimización del tiempo de extracción. .

6.3.3. Rendimientos

La Figura 32 muestra los rendimientos para el diseño experimental 2. El extracto etanólico del punto n°9 representó el extracto con mayor rendimiento (3,6%), con un contenido en grasa del 2,2%, mientras que para el soxhlet realizado con etanol, los mayores rendimientos etanólicos y de grasa obtenidos fueron respectivamente 6,6% y 1,2%, lo que indica para la

extracción supercrítica un favorecimiento de la extracción de grasa, con respecto a la obtención de compuestos de alta polaridad; esto debido al uso de una menor cantidad de cosolvente y un menor tiempo de extracción. La Tabla 14 muestra los datos obtenidos para la construcción de la gráfica. Es importante aclarar que estos rendimientos no se pueden someter análisis Tukey puesto que este tipo de diseño experimental no se tuvo réplicas.

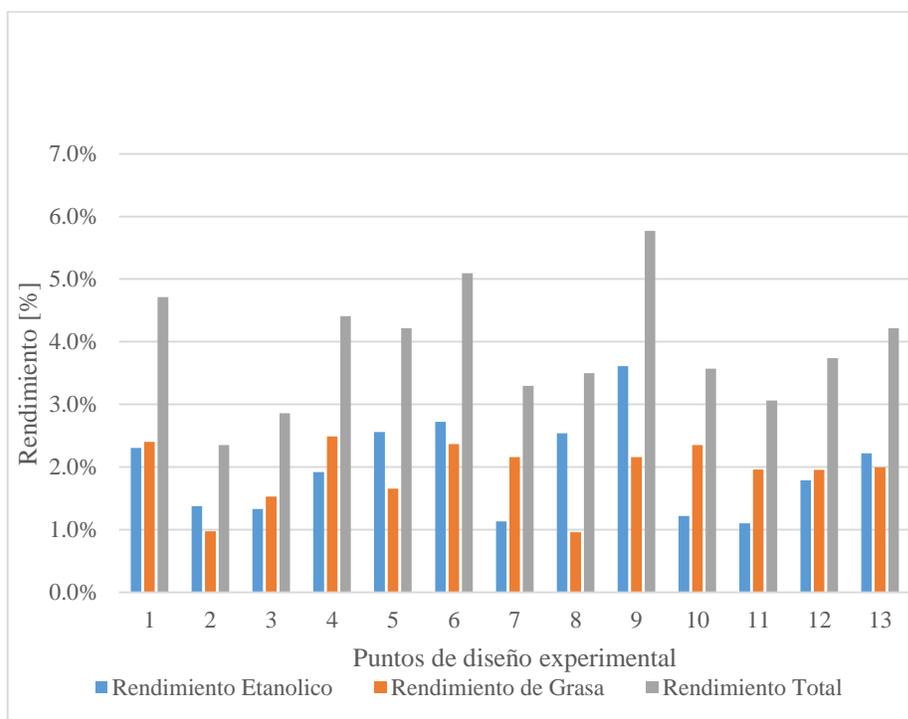


Figura 32. Rendimientos obtenidos para extracción con CO₂-EtOH.

Tabla 14. Rendimientos obtenidos por EFS (CO₂ con EtOH).

Punto	Presión bar	Cosolvente % p/p	Rendimiento Etanólico %	Rendimiento Grasa %	Rendimiento Total %
1	150,0	20,0	2,3%	2,4%	4,7%
2	200,0	7,9	1,4%	1,0%	2,4%
3	150,0	10,0	1,3%	1,5%	2,9%
4	270,7	15,0	1,9%	2,5%	4,4%
5	200,0	15,0	2,6%	1,7%	4,2%
6	250,0	20,0	2,7%	2,4%	5,1%
7	200,0	15,0	1,1%	2,2%	3,3%
8	129,3	15,0	2,5%	1,0%	3,5%
9	200,0	22,1	3,6%	2,2%	5,8%

10	200,0	15,0	1,2%	2,4%	3,6%
11	200,0	15,0	1,1%	2,0%	3,1%
12	250,0	10,0	1,8%	2,0%	3,7%
13	200,0	15,0	2,2%	2,0%	4,2%

6.3.4. Contenido Total de Fenoles

Se observa que todos los extractos tienen una cantidad similar de polifenoles (Figura 33). Sin embargo, se destacó el extracto 6 (250 bar, 20% de etanol) con 44,433 mg-eq AG/g extracto. Al expresarlo por gramo de cascarilla (Figura 34), se observa que los más selectivos son los extractos 6 (250 bar y 20% etanol) con 1,165 mg-eq AG/g extracto y 9 (200 bar y 22% etanol) con 1,191 mg-eq AG/g extracto (Tabla 15). Estos resultados en comparación a los obtenidos a través de extracción Soxhlet fueron menores, principalmente por que esta última técnica utiliza mayor cantidad de solvente y hay una renovación constante del mismo, lo que aumenta la capacidad de transferencia de masa de la matriz hacia el solvente, del mismo modo el tiempo de contacto empleado fue mayor lo que también incrementa la capacidad de extracción.

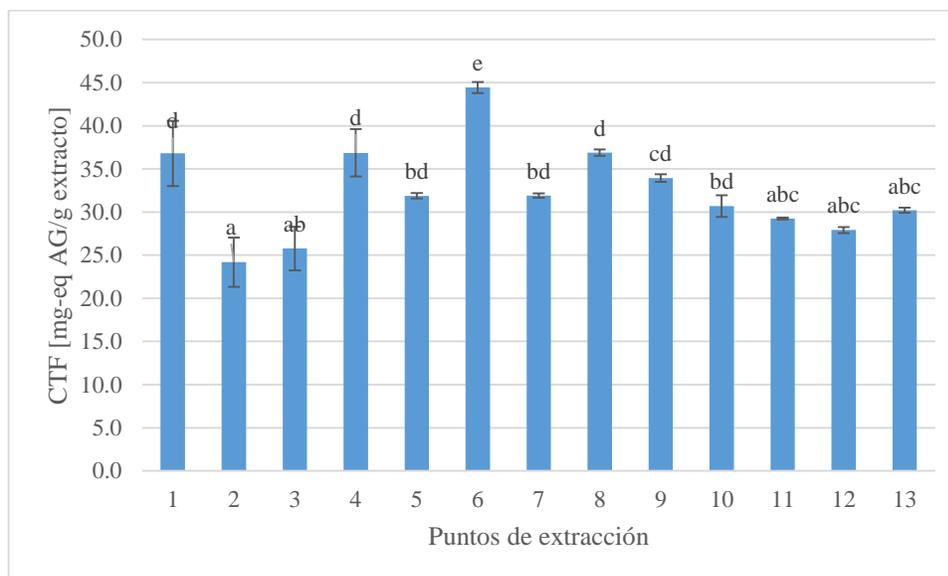


Figura 33. CTF de los extractos supercríticos expresado en mg-eq de AG/g de extracto. .

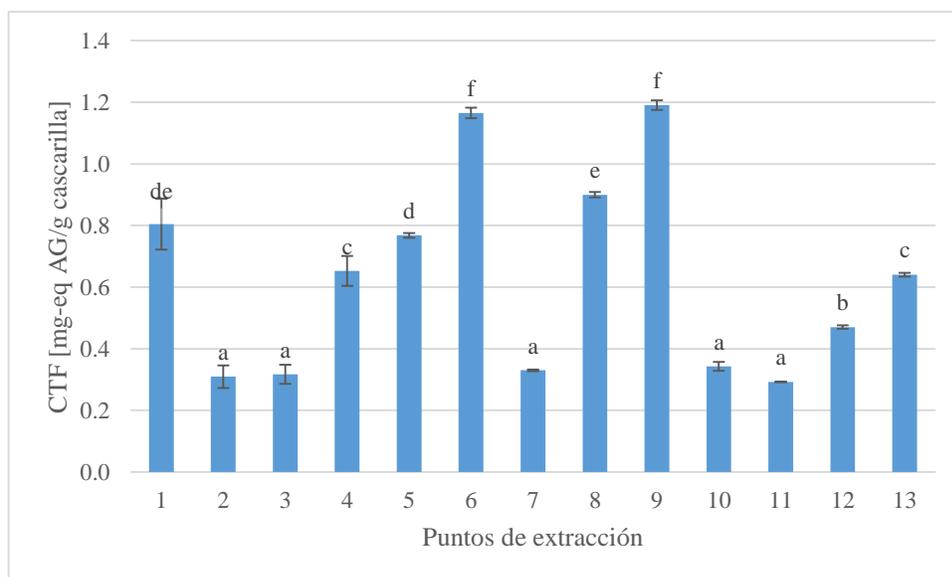


Figura 34. CTF de los extractos supercríticos expresado en mg-eq de AG/g de cascarilla seca. .

Tabla 15. CTF de los extractos supercríticos. .

Extractos	mg eq AG/g extracto	mg eq AG/ g cascarilla
1	36,801 ± 3,788	0,805 ± 0,083
2	24,190 ± 2,859	0,310 ± 0,037
3	25,770 ± 2,514	0,317 ± 0,031
4	36,860 ± 2,756	0,653 ± 0,049
5	31,881 ± 0,304	0,768 ± 0,007
6	44,433 ± 0,637	1,165 ± 0,017
7	31,911 ± 0,263	0,330 ± 0,003
8	36,890 ± 0,360	0,900 ± 0,009
9	33,939 ± 0,446	1,191 ± 0,016
10	30,689 ± 1,257	0,343 ± 0,014
11	29,258 ± 0,112	0,293 ± 0,001
12	27,916 ± 0,345	0,470 ± 0,006
13	30,212 ± 0,292	0,640 ± 0,006

6.3.5. Actividad antioxidante por captación de radical DPPH

Los resultados obtenidos para DPPH de los extractos supercríticos, mostraron como el más activo al extracto 6, con un porcentaje de inhibición de 18,9% (Figura 35), seguido por el extracto 4, con un valor del 14,8%; siendo éstos significativamente diferentes a los demás (Figura 36). Este primer extracto es el que posee la mayor cantidad de compuestos

antioxidantes reductores del radical DPPH que puede ser extraída de la matriz de todo el diseño experimental al representar los datos por gramo de cascarilla (Figura 37). En general, la representación por gramo de cascarilla para el DPPH no refleja cual es el extracto más activo, sino que indica la cantidad efectiva de antioxidantes que pueden ser capaz de reducir una cantidad determinada de DPPH. Dado que esta prueba se hace utilizando todos los extractos a la misma concentración, el que obtenga un mayor valor de $\mu\text{mol Trolox/g}$ cascarilla será el extracto del cual se puedan sacar más dosis de antioxidantes para aplicar a un alimento, ya que la expresión de la actividad antioxidante en estas unidades está relacionada con el rendimiento, por lo que entre varios extractos a la misma concentración (mg extracto/mL), será más competitivo con respecto a un antioxidante comercial el que tenga mayor cantidad de mol de Trolox/g cascarilla. En ese sentido, se desea que los extractos posean alta actividad antioxidante por gramo de extracto, como por gramo de cascarilla. Este permite decir que el extracto es significativamente activo y competitivo, respectivamente, aunque no necesariamente rentable, puesto que los métodos de obtención son diferentes. Por esto es necesario que se realicen evaluaciones económicas de proceso para verificar este parámetro.

La Tabla 16 muestra los resultados utilizados para la realización de las gráficas 35 - 37.

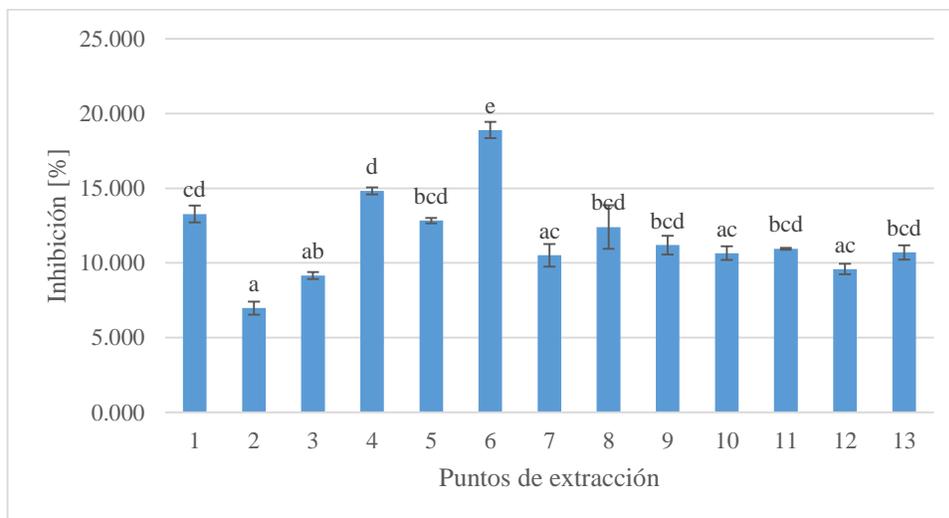


Figura 35. Actividad antioxidante de los extractos supercríticos expresados en % de inhibición a la oxidación.

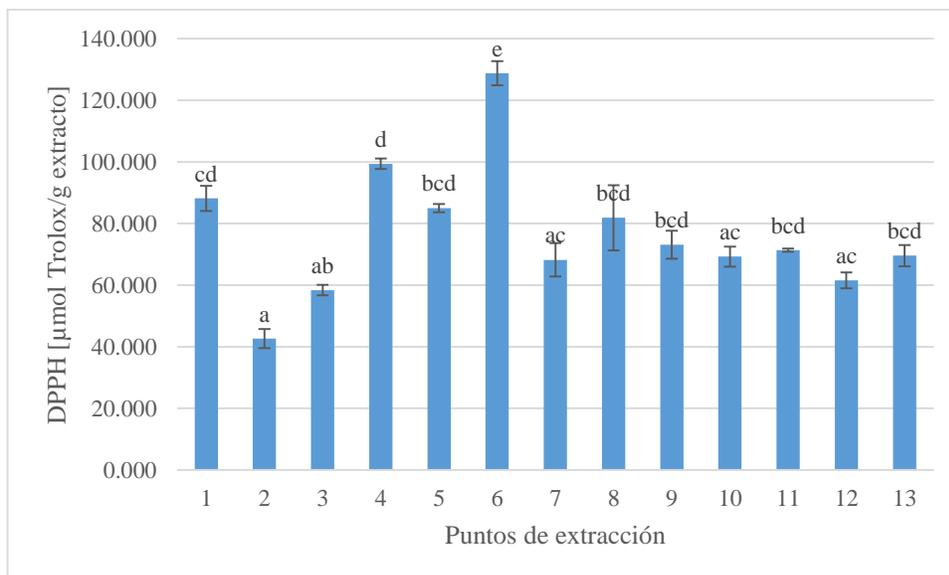


Figura 36. Actividad antioxidante de los extractos supercríticos expresados en μmol de Trolox/g extracto. .

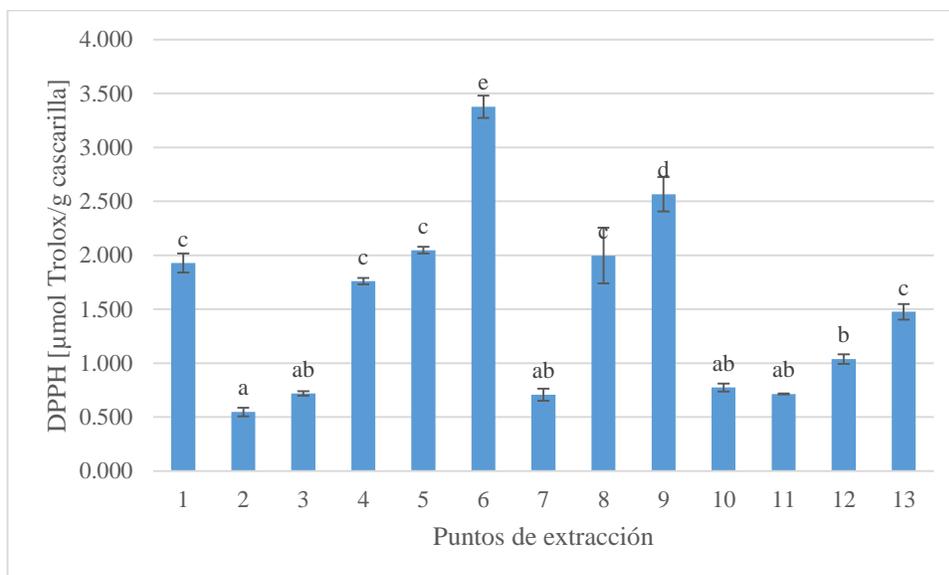


Figura 37. Actividad antioxidante de los extractos supercríticos expresados en μmol de Trolox/g cascarilla seca. .

Tabla 16. Actividad antioxidante de los extractos supercríticos. .

Extractos	% inhibición	μmol Trolox/g extracto	μmol Trolox/g cascarilla
1	13,3 ± 0,6	88,165 ± 4,053	0,597 ± 0,089
2	7,0 ± 0,4	42,647 ± 3,092	0,818 ± 0,040
3	9,2 ± 0,2	58,403 ± 1,715	1,234 ± 0,021
4	14,8 ± 0,2	99,370 ± 1,715	1,391 ± 0,030
5	12,8 ± 0,2	85,014 ± 1,310	1,19 ± 0,032

6	18,9 ± 0,5	128,782 ± 3,930	1,803 ± 0,103
7	10,5 ± 0,8	68,207 ± 5,447	0,955 ± 0,056
8	12,4 ± 1,5	81,863 ± 10,856	1,146 ± 0,258
9	11,2 ± 0,6	73,109 ± 4,538	1,024 ± 0,159
10	10,7 ± 0,4	69,258 ± 3,247	0,970 ± 0,036
11	10,9 ± 0,1	71,359 ± 0,495	0,999 ± 0,005
12	9,6 ± 0,4	61,555 ± 2,573	0,862 ± 0,043
13	10,7 ± 1,9	69,608 ± 3,768	1,476 ± 0,044

6.4. Comparación de resultados entre extractos Soxhlet, supercríticos y datos encontrados en literatura científica

Se compararon los resultados obtenidos de los extractos soxhlet y supercríticos más activos (con mayor actividad antioxidante) en términos de contenido de polifenoles y actividad antioxidante por el método de DPPH, bajo metodologías similares. Hay que destacar que para DPPH se compararon únicamente las dos metodologías de extracción empleadas en la presente investigación por no encontrarse metodologías suficientemente comparables.

De acuerdo a la Tabla 17 se observan datos similares de contenido total de polifenoles para cáscara de semilla de cacao de Ecuador y Venezuela, así como se observa cierta similitud con otros residuos de biomazas con alto contenido en compuestos fenólicos como la uva, de la cual el orujo es un residuo de la industria vinífera. Sin embargo, el contenido de polifenoles presentes en la semilla de cacao colombiano es 20 veces mayor, así como el de té verde.

Tabla 17. Comparación de contenido total de fenoles de cáscara de semilla de cacao colombiana y de otros orígenes, así como CTF de otras biomazas.

Referencia	Materia prima	Tipo de extracción	CTF
			[mg eq AG/g cascarilla]
Presente investigación	Colombia	Soxhlet AcOEt-EtOH	1,971 ± 0,142
		Soxhlet EtOH	2,399 ± 0,115
		Extracción (4) CO ₂ -SC. 270 bar. Etanol 15%	0,653 ± 0,049
		Extracción (6) CO ₂ -SC. 250 bar. Etanol 20%	1,165 ± 0,017
(Bruna & otros, 2009)	Madagascar		4,06

	Ghana	Extracción en frío con MeOH-HCl 0,1% (15/85, v/v)	3,47
	Venezuela		2,63
	Ecuador		2,56
	Trinidad		3,91
(Martínez, y otros, 2012)	Taura y Cone- Ecuador	Maceración con MeOH-AcO (70:30, v/v)	1,496
	Taura y Cone -Ecuador	Maceración con etanol	0,813
(Carrillo & otros, 2014)	Semilla de cacao colombiano	Muestra desengrasada Extracción con 2-propanol	51,47 ± 2,07
(Da Porto & Decorti, 2014)	Orujo de uva- Italia	CO ₂ -SC + 15% EtOH	2,68 ± 0,06
(Molan, De, & Meagher, 2009)	Infusiones de té verde	Temp extracción= 60°C, 3 min	30,2 ± 1,4

De la Tabla 18 se observa que el mejor extracto es el soxhlet con AcOEt-EtOH, presentando un porcentaje de inhibición cercano al 31%. Esto pudo deberse a que el acetato de etilo, solvente de mediana polaridad entre los empleados, es capaz de solubilizar la grasa y con esto limpiar la matriz permitiendo que los polifenoles se encuentren más accesibles para que el etanol pueda extraerlos. Esta interferencia de la grasa se explica a que los polifenoles se encuentran encapsulados dentro de la célula de la matriz vegetal (Wollgast & Anklam, 2000). En ese sentido, la extracción previa con acetato de etilo estaría dirigida hacia la extracción de grasas más que a la extracción de polifenoles, por la saturación del solvente con la misma.

Tabla 18. Tabla comparativa de actividad antioxidante de cáscara de semilla de cacao colombiana extraída con CO₂ supercrítico y soxhlet. .

Referencia	Materia prima	Tipo de extracto	AA-DPPH [μmol Trolox/g muestra]	AA-DPPH [% inhibición]
Presente investigación	Colombia	Soxhlet AcOEt + EtOH	8,411 ± 0,356	30,8 ± 1,3
		Soxhlet EtOH	10,016 ± 0,115	22,6 ± 0,2
		Extracción (4) CO ₂ -SC. 270 bar. Etanol 15%	1,760 ± 0,030	14,8 ± 0,2
		Extracción (6) CO ₂ -SC. 250 bar. Etanol 20%	3,378 ± 0,103	18,9 ± 0,5

6.5. Análisis estadístico: diseño experimental n.º 2

Hay que mencionar que los datos tanto de CTF y AA por gramos de cascarilla (Tabla 15 y 16) y se obtienen al multiplicar los datos de CTF y AA por gramo de extracto por el rendimiento etanólico. La Tabla 19 es el resumen estadístico del experimento. La asimetría estándar indica que los datos están concentrados hacia la izquierda respecto a la media de todos los datos, con un grado de aglomeración moderado (mesocúrtica) a partir del valor de Curtosis, por lo tanto indica que el diseño experimental abarca un rango moderado para predecir los comportamientos de las variables.

De acuerdo al análisis de varianza (Tabla 20) para las variables de respuesta del diseño experimental, los resultados para p-valor son menores que 0,05 tanto para rendimiento total, CTF y AA, lo que indica que todos los datos son diferentes entre sí para cada uno de los efectos estudiados de las variables independientes. Los resultados de p-valor para rendimiento etanólico y rendimiento de grasa son ligeramente mayores que el α estadístico (0,05). Esta última variable denota el nivel de significancia de la prueba, es decir que si $p\text{-valor} > \alpha$ el resultado de inferencia estadística es menos confiable. Esto se debió al pequeño tamaño de muestra empleada para la extracción (20 g de cascarilla), por consiguiente los extractos también, lo que provocó que al momento de separar la grasa de la fase solvente, pequeñas cantidades no fueran completamente separadas debido a la saturación con el etanol, por lo

que aportaron a los cálculos de rendimiento de la fase solvente ocasionando una ligera similitud entre los datos. Esto sugiere que se requiere realizar un estudio con mayor cantidad de muestra para extraer mayor cantidad de extractos, con el objetivo de que las pequeñas cantidades de trazas de grasa que no puedan ser separadas sean menos representativas sobre los valores de rendimiento. Por otra parte el modelo estadístico cuadrático ajustado con cada variable de respuesta explica más del 80% del comportamiento de la variabilidad de las respuestas.

Tabla 19. Resumen estadísticos para resultados obtenidos para la extracción supercrítica. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

	Cosolvente (%p/p)	Presión(bar)	CA (µmol Trolox/g de cascarilla)	CTF (mg-eq AG/g de cascarilla)
Corridas	13,0	13,0	13,0	13,0
Media	15,0	200,0	1,6	0,7
Desviación Estándar	4,1	40,8	0,9	0,3
Coefficiente de Variación	0,3	0,2	0,6	0,5
Mínimo Valor	7,9	129,3	0,6	0,3
Máximo Valor	22,1	270,7	3,5	1,2
Rango	14,1	141,4	2,9	0,9
Asimetría estándar	0,0	0,0	1,1	0,8
Curtosis estándar	-0,2	-0,2	-0,03	-0,7

6.5.1. Correlación entre CTF y la actividad antioxidante

La Figura 38 muestra la correlación que existe entre las variables de respuesta. Los resultados experimentales se ajustaron en un 93,12% a un modelo lineal, con un coeficiente de correlación de 93,92% según Pearson lo que indica que sí existe una correlación de los polifenoles que son identificados mediante la técnica utilizada y la actividad antioxidante. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede realizar un ajuste del modelo estadístico para CTF y luego estimar los posibles efectos de la actividad antioxidante, que es la variable de respuesta de mayor interés, a través de la regresión lineal propuesta (ecuación 22) para predecir el comportamiento de esta variable en función del CTF.

$$AA = -0,150361 + 2,63136 * TPC \quad (Ec. 22)$$

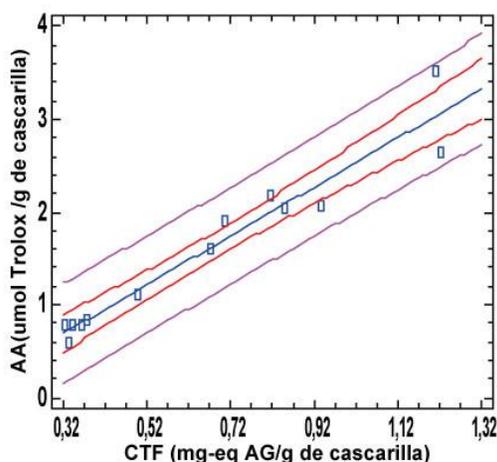


Figura 38. Correlación entre Contenido Total de Polifenoles (CTF) y Actividad Antioxidante. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

6.5.2. Regresión no lineal para los resultados experimentales

Para el modelo estadístico se observó el efecto de cada una de las variables consideradas y la interacción entre ellas. La Figura 39 indica el efecto estandarizado de las variables independientes sobre las respuestas del proceso. Se observa que la variable con mayor efecto sobre todas las respuestas fue el porcentaje de cosolvente, lo que sugiere que la extracción de los polifenoles presentes en la cáscara de la semilla del cacao son favorecidos en su mayoría por la adición de un solvente polar, debido a su afinidad con la polaridad de los analitos de la matriz. El p-valor del efecto estandarizado del cosolvente (Tabla 21 y 22) es menor a 0,05, indicando que los efectos generados por esta variable son lo suficientemente significativos como para diferenciar entre sí los valores tanto de rendimiento total como de CTF. Del mismo modo la presión tiene un efecto medianamente significativo sobre el contenido total de polifenoles (Figura 39.d), lo que quiere decir que cambios ligeros en la presión tienen efecto sobre el poder de solvatación de la mezcla CO₂ supercrítico-etanol, lo cual es un comportamiento característico de los fluidos supercríticos. No obstante, su efecto positivo se mantiene entre ciertos rangos de operación por lo que no puede considerarse que aumentar la presión fuera del diseño experimental incremente los valores. Desde el punto de vista químico, el aumento de la presión favoreció la selectividad de los solventes hacia la extracción de más compuestos polifenólicos que otro de tipo de compuestos con estructura química diferente, además favoreció el ingreso de los agentes extractores en la matriz de la

cascarilla (Luque de Castro, 1993). Se observó que tanto el rendimiento total como el contenido total de polifenoles aumentaron significativamente por el aumento del cosolvente.

Tabla 20. Análisis de Varianza para resultados obtenidos para la extracción supercrítica. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

Modelo	Rendimiento Etanólico	Rendimiento Grasa	Rendimiento Total	CTF (mg-eqAG/g de cascarilla)	AA (μmol Trolox/g de cascarilla)
P-valor	0,18	0,08	0,01	0,03	0,03
Error d.f.	7,00	7,00	7,00	7,00	7,00
Stand. error	0,01	0,00	0,00	0,21	0,56
R ²	59,83	69,79	87,21	76,93	76,92
Adj. R ²	31,14	48,21	78,07	60,45	60,44

Tabla 21. Análisis de Varianza para Rendimiento Total. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

Efecto	Suma de Cuadrados	Df	F-Relación	P-Valor
A:Presión	7,64E-05	1	3,92E+00	0,088
B:cosolvente	8,02E-04	1	4,12E+01	0,000
AA	1,64E-05	1	8,40E-01	0,389
AB	4,00E-06	1	2,10E-01	0,664
BB	3,64E-05	1	1,87E+00	0,214
Total error	1,36E-04	7		
Total (corr.)	1,07E-03	12		

Tabla 22. Análisis de Varianza para Contenido Total de Polifenoles (CTF). Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

Efecto	Suma de Cuadrados	Df	Relación- F	P-Valor
A:Presión	4,66E-03	1	0,11	0,749
B:cosolvente	7,68E-01	1	18,23	0,004
AA	1,32E-01	1	3,13	0,120
AB	1,06E-02	1	0,25	0,632
BB	9,38E-02	1	2,22	0,180
Total error	2,95E-01	7		
Total (corr.)	1,28E+00	12		

La Figura 39 muestra el aumento de las variables de respuesta por el cambio en las variables independientes. Se observa que la variable que más influyó sobre las respuestas fue el porcentaje de cosolvente. Bien se ha demostrado que el aumento en el porcentaje de cosolvente aumenta la extracción de grasa (Salajegheh & otros, 2013; Teng-ju & otros, 2008; Asep & otros, 2013; Asep, y otros, 2008), por lo cual al momento de realizar la simulación del proceso a escala industrial se debe considerar el proceso más adecuado para su

separación. Sin embargo la modificación que hace la utilización del etanol a la constante dieléctrica de la mezcla provoca que se extraigan compuestos de mayor polaridad (Weize, y otros, 2004), como se presume, son los polifenoles, así como maximiza las ventajas de líquido que posee el CO₂ supercrítico (mayor poder de solvatación debido a su mayor densidad) (Luque de Castro, 1993), con lo que se explica que a mayor presión y porcentaje de cosolvente se obtengan mayores valores de rendimiento total y contenido total de polifenoles. La presión tuvo el efecto de aumentar las variables de respuestas al aumentar su valor, sin embargo estos cambios fueron menos significativos que los generados con el cosolvente, ya que este último disminuye la presión de operación óptima para la extracción de analitos, por lo que aumentar la presión en gran medida no va afectar la extracción de analitos en la medida que lo hará el aumento de porcentaje de co-solvente.

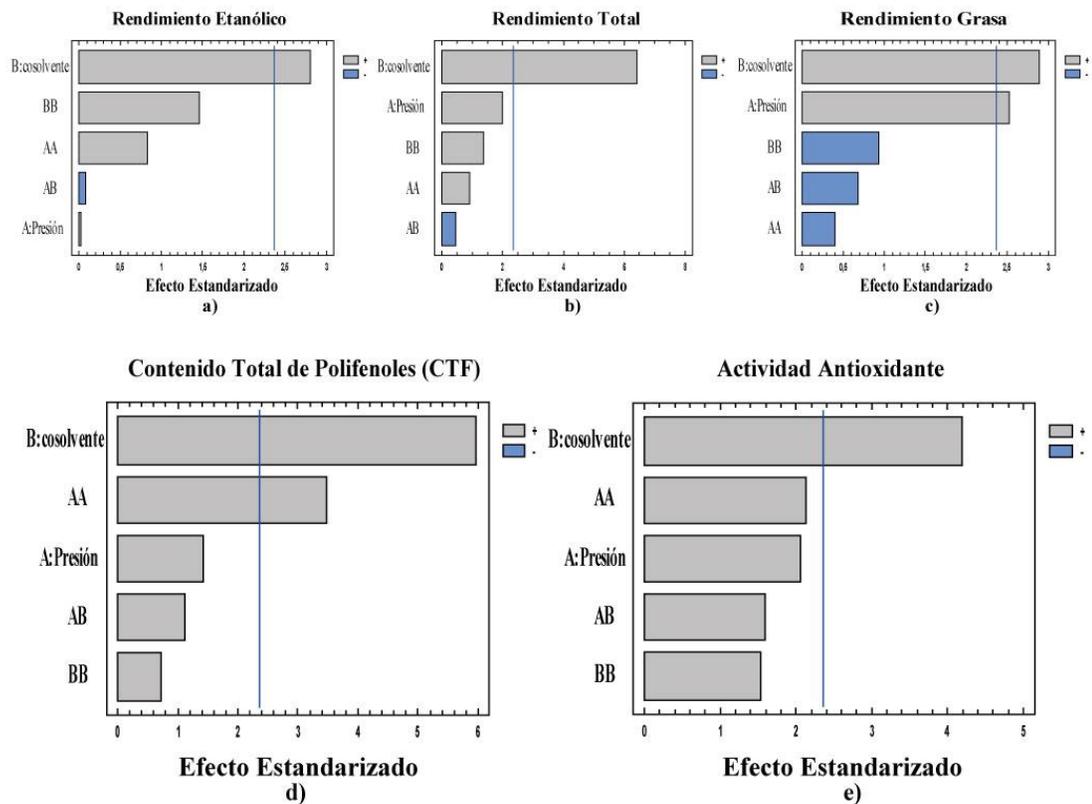


Figura 39. Diagrama de Pareto estandarizado de los resultados obtenidos del diseño experimental. La barra gris indica aumento o un incremento sobre la variable de respuesta. La barra azul indica efecto de disminución de la variable de respuesta. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

La Figura 41 muestra la superficie de respuesta obtenida para los valores experimentales de Contenido Total de Polifenoles ajustados al modelo estadístico de la ecuación (23). En la Tabla 23 se relacionan los resultados de las constantes con sus respectivos errores estándar, el modelo explica el 76.93% (Tabla 24) de los efectos generados por las variables manipuladas y en general indica que a mayor presión y porcentaje de cosolvente se obtienen mayores CTF. Este modelo no se ajustó a más 90% por distintos factores, a saber: (i) los valores para Contenido Total de Polifenoles por gramo de cascarilla fueron calculados a partir del rendimiento etanólico, estos últimos poseen una dispersión respecto a los datos reales debido a que la grasa no se logró separar completamente de la fase solvente, lo que generó un aumento en los pesos de todos los extractos ocasionando que estadísticamente fueran similares entre sí, tal como lo indica el p-valor en la Tabla 22 para el rendimiento etanólico; (ii) durante el proceso de evaporación del etanol para determinar el peso real del extracto con polifenoles, la eficiencia de la evaporación no fue 100% completa, esto siguiendo los principios de equilibrio termodinámico para una mezcla; (iii) durante la etapa de extracción supercrítica, se pudieron haber perdido analitos durante la despresurización debidas al arrastre que ejerce el caudal de CO₂.

Tabla 23. Resultados estimados para regresión no lineal del modelo estadístico para Contenido Total de Polifenoles.
Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

Parámetro	Valor estimado	Error estándar	Intervalo De confianza:	
			Más Bajo	Más Alto
a	-0,0246445	0,0139702	-0,057679	0,00838994
b	-0,118467	0,125224	-0,414575	0,177641
c	0,00020568	0,00041063	-0,0007653	0,00117665
d	5,5106E-05	3,1137E-05	-1,8522E-05	0,00012873
e	0,00464385	0,00311371	-0,00271892	0,0120066
f	3,34873	1,92785	-1,20991	7,90737

$$CTF = -0,0246445x - 0,118467y + 0,000205675xy + 0,0000551057x^2 + 0,00464385y^2 + 3,34873 \quad (23)$$

Donde *y* es %p/p de cosolvente y Presión es *x*.

Tabla 24 Análisis de Varianza para Modelo estadístico para la determinación de CTF en función de la presión y el cosolvente. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

Datos	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado Medio
Modelo	6,735	6	1,123
Residual	0,295	7	0,042
Total	7,030	13	
Total (Corr.)	1,279	12	

$R^2 = 76,927 \%$
 R^2 (Ajustado) = 60,4463 %
 Error Estándar = 0,205313
 Media del Error Absoluto = 0,133133

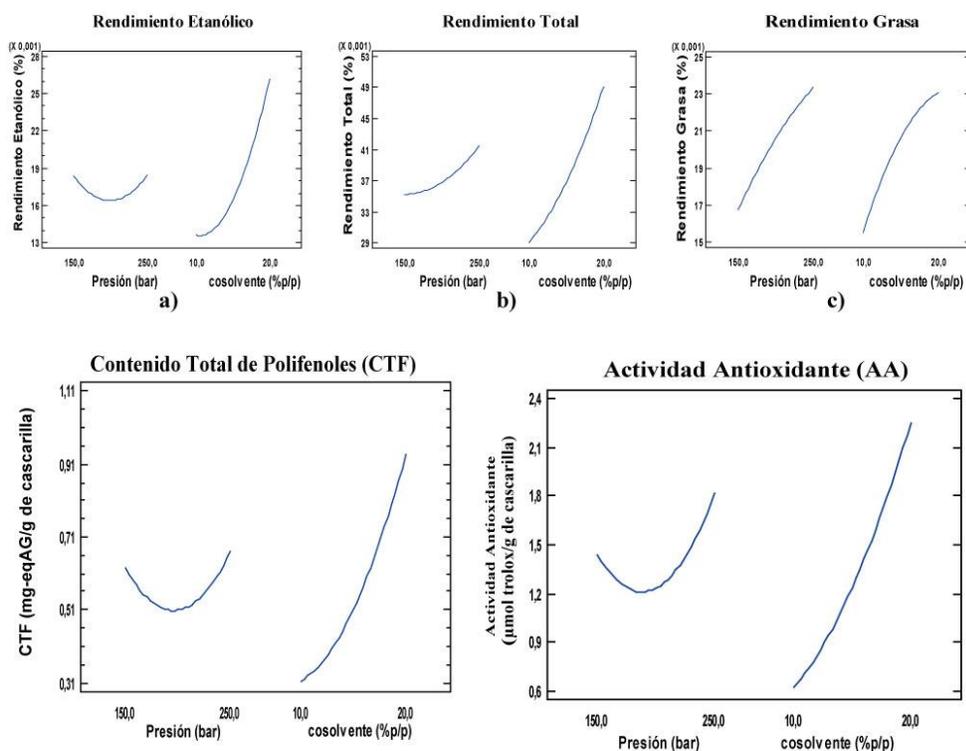


Figura 40. Efectos de las variables independientes sobre las variables de respuesta. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

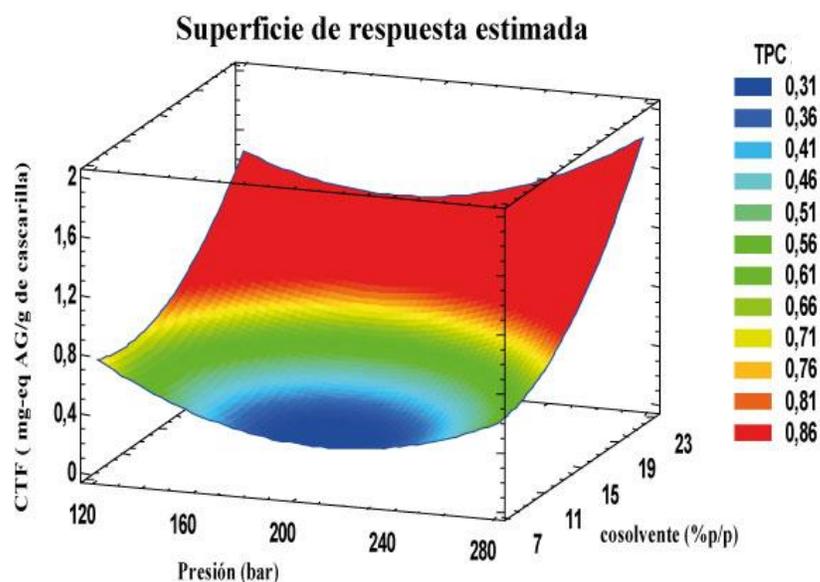


Figura 41. Superficie de respuesta estimada para Presión y Cosolvente vs Contenido Total de Polifenoles (CTF). Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

6.5.3. Optimización del proceso de extracción supercrítica

La Tabla 25 son los resultados arrojados por STATGRAPHICS XVI para la optimización del proceso. Para el proceso de optimización se escogieron las variables: Rendimiento Total y Contenido Total de Polifenoles (CTF). Esto se justifica por los valores estadísticos de p-valor; los cuales son menores que 0,05 (Tabla 19), y por existir una correlación proporcional entre el CTF y AA; además el modelo estadístico ajustado a la actividad antioxidante describe en menor medida la variabilidad del proceso. El punto óptimo para obtener el mejor rendimiento total y la mayor cantidad de polifenoles es a las condiciones de 251 bar y 22% de etanol como co-solvente, obteniendo un valor de CTF 1,411 mg-eq AG/g de cascarilla y un rendimiento del 5,9%. Esto es acorde a los efectos de las variables durante todo el estudio: a mayor presión, mayor selectividad y mejor penetración en la matriz y a mayor co-solvente, mayor polaridad y afinidad con los compuestos deseados. Finalmente, este resultado se comparó con los tratamientos experimentales más similares a estas condiciones y se seleccionó para realizar la prueba de aceites los extractos 6 (denominado seis) y 4 (denominado cuatro). Es de destacar que el extracto 6 posee condiciones muy similares a las

indicadas por el punto óptimo. Del mismo modo estos extractos correspondieron a los más activos en el ensayo de DPPH.

Tabla 25. Resultados de Optimización de respuesta. Tomado de los datos arrojados por el *software* Statgraphics.

Variables de Respuesta	Optimizado	Predicción	Límite inferior 95,0%	Límite Superior 95,0%	Deseabilidad
Rendimiento Etanólico (%)	no	0,033771	0,0169684	0,0505736	0,91084
Rendimiento Grasa (%)	no	0,0242825	0,0145259	0,0340391	0,047836
Rendimiento Total (%)	Si	0,0586119	0,0468641	0,0703596	1
CTF (mgeq-AG/g de cascarilla)	Si	1,41124	0,864686	1,95779	1
AA (μmol Trolox/g de cascarilla)	no	3,7948	2,31061	5,27899	1
Conveniencia de optimización = 1					
Valores óptimos para variables de entrada					
Factor	Valores				
Presión (Bar)	250,9				
cosolvente (%p/p)	22				

6.6. Actividad antioxidante de los extractos más activos en aceite vegetal

Al evaluar la protección que los extractos pueden dar al aceite comestible contra la oxidación lipídica se midió la formación de hidroperóxidos (Figura 42, Tabla 26) y de TBARS (Figura 43, Tabla 27). Se observó una etapa detenimiento en la formación de hidroperóxidos, lo que puede indicar que los antioxidantes interrumpen la etapa de propagación de la autooxidación de lípidos lo que indica que los compuestos fenolicos presentes son de tipo primario. En ese sentido, tanto el TBHQ como el AG actúan adecuadamente como antioxidantes primarios, del mismo modo, todos los extractos soxhlet y supercríticos, poseen valores similares de formación de hidroperóxidos, lo que indica que detienen en igual medida la generación de éstos. En general todos los extractos presentaron inhibición de oxidación al ser todos los valores menores a la muestra de aceite sin antioxidantes.

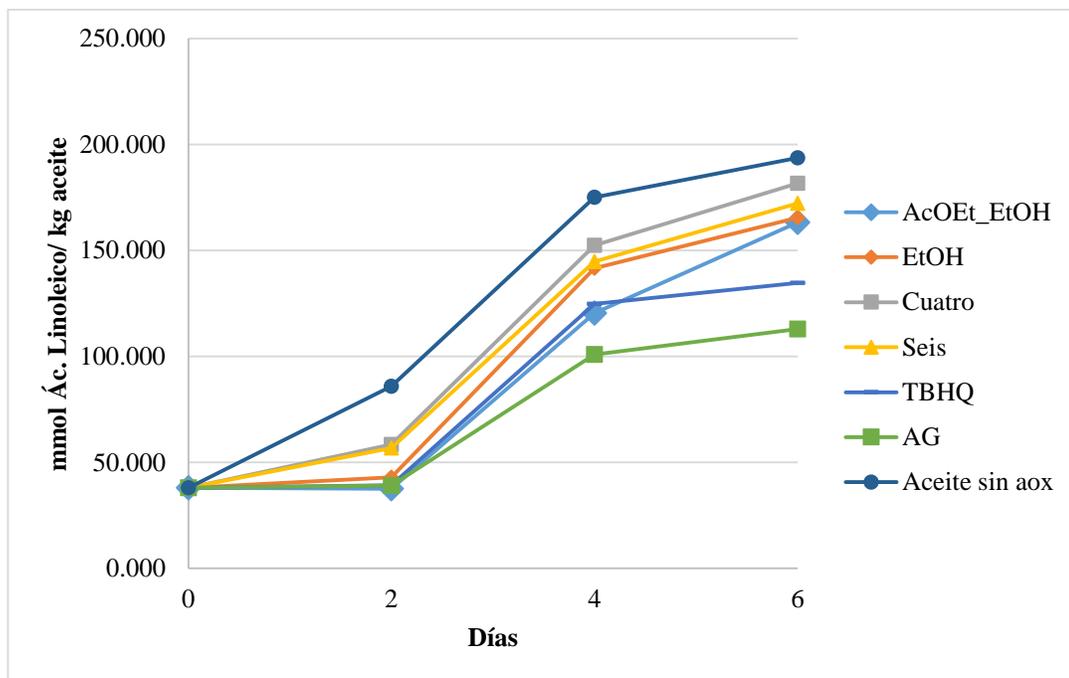


Figura 42. Cinética de oxidación de aceite a través de la cuantificación de hidroperóxidos totales.

Tabla 26. Cinética de producción de hidroperóxidos totales. Promedios con letras diferentes fueron significativamente al nivel de p-valor (prueba Tukey).

	Día 0	Día 2	DE	Día 4	DE	Día 6	DE
AcOEt_EtOH	37,987	37,479 ^a	3,358	120,367 ^b	0,424	163,248 ^c	5,888
EtOH	37,987	42,868 ^a	3,764	141,646 ^c	8,457	165,446 ^{cd}	9,593
Cuatro	37,987	58,450 ^b	1,321	152,496 ^c	5,634	181,670 ^{de}	8,448
Seis	37,987	56,795 ^b	2,304	144,767 ^c	5,949	172,284 ^{cd}	2,791
TBHQ	37,987	39,216 ^a	0,200	124,733 ^b	0,143	134,766 ^b	5,901
AG	37,987	39,081 ^a	1,360	100,950 ^a	1,850	112,953 ^a	3,741
Aceite CONTROL	37,987	85,873 ^c	6,176	175,126 ^d	5,270	193,748 ^e	7,006

Respecto a los TBARS formados por acción de los extractos, todos presentaron valores inferiores respecto a la muestra de aceite sin antioxidante durante el experimento, lo que permite afirmar que los extractos poseen la capacidad de inhibir la oxidación aproximadamente un 75% respecto a la acción del TBHQ. Del mismo modo las técnicas de extracción permiten obtener analitos que poseen comportamientos similares si en cuanto a la inhibición de la oxidación. Esto permite reafirmar que el etanol es la variable más influyente de todo el estudio en cuanto a su capacidad de extraer analitos con actividad antioxidante se

refiere. Por tanto, a partir de la cascara de la semilla del cacao colombiano es posible obtener extractos con actividad antioxidante comparable con la de un antioxidante comercial, ampliamente utilizado a nivel comercial (TBHQ).

Se observa que a pesar que la cáscara de la semilla del cacao colombiano posee una menor cantidad de polifenoles respecto a cáscaras de otras regiones y otras biomasas esta logró tener una actividad antioxidante comparable con un antioxidante comercial, ampliamente utilizado a nivel comercial (TBHQ). Este resultado sugiere que el tipo de polifenoles presentes en la cascarrilla de cacao colombiano poseen una buena actividad antioxidantes por su capacidad de inhibir la oxidación.

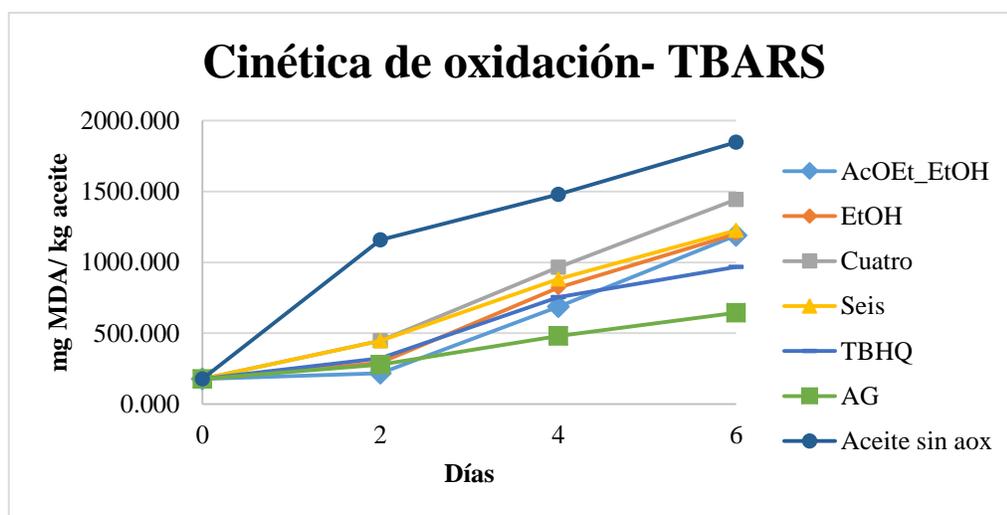


Figura 43. Cinética de oxidación del aceite a través la cuantificación de especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico. .

No obstante, los difieren con respecto a la técnica de captación de radicales (DPPH), puesto que para esta se obtuvo un porcentaje de inhibición para los patrones del 96% (Tabla 13), mucho mayor que los extractos, el cual mejor valor fue del 31%. Sin embargo, esta brecha se ve reducida en el ensayo de oxidación de aceite. Lo que permite decir que el método de DPPH solo muestra la capacidad reductora de las especies a este radical pero el aceite, y en general los alimentos, presentan otro tipo de especies radicalarias que deben ser neutralizadas y pueden hacerlo los antioxidantes presentes en la cáscara de la semilla del cacao. Además, los ya reportados efectos de sinergia que se presentan en antioxidante cuando se encuentra presente con otras especies, hacen que la inhibición de la oxidación se mejore, por lo que este

método no constituye una respuesta definitiva para medir la capacidad antioxidante de un extracto de forma práctica.

Tabla 27. Cinética de producción de especies reactivas al Ácido Tiobarbitúrico. Promedios con letras diferentes fueron significativamente al nivel de p-valor (prueba Tukey)

	Día 0	Día 2	DE	Día 4	DE	Día 6	DE
AcOEt_EtOH	178,419	218,780 ^a	21,433	687,544 ^b	29,343	1190,217 ^{bc}	109,985
EtOH	178,419	292,940 ^a	26,834	822,109 ^{bd}	60,999	1201,930 ^c	115,885
Cuatro	178,419	447,076 ^b	9,929	964,280 ^d	46,387	1442,681 ^d	99,689
Seis	178,419	447,572 ^b	36,131	881,800 ^{cd}	10,259	1225,523 ^{cd}	55,281
TBHQ	178,419	323,600 ^{ab}	30,727	754,991 ^{bc}	77,101	967,097 ^b	62,149
AG	178,419	279,224 ^a	16,685	479,527 ^a	46,640	643,861 ^a	63,012
Aceite CONTROL	178,419	1158,041 ^c	105,149	1479,649 ^e	63,235	1846,733 ^e	48,656

6.7. Evaluación económica

La Tabla 29 resume los datos de inversión y costo de mayor interés para el análisis económico para la planta de extracción de antioxidantes a partir de la cáscara de la semilla de cacao.

Tabla 28. Resumen Financiero. Tomado de los resultados arrojados por el *software* Aspen Hysys.

Nombre del Proyecto	EPC	Costo de Capital	Costo de Operación	TIR
Antioxidantes cacao	del 31 Duración	\$7.050.000	\$4.807,000	25%

La simulación permitió simular un proceso capaz de producir antioxidantes con la posibilidad obtener rentabilidad considerable después de su producción.

Al obtener una TIR mayor a la tasa estandarizada de 20% (Tabla 28), este indica que el proceso presenta mejores beneficios a largo plazo que los generados al invertir en un banco con esta tasa establecida, por lo que puede ser aceptado como proyecto de inversión.

Tabla 29. Resumen de Inversión y Costos del Proceso. Tomado de los resultados arrojados por el *software* Aspen Hysys.

Concepto	Unidades	
Semanas por periodo	Semanas/periodo	52
Periodo de Análisis	Periodo	20
Duración de la Fase EPC	Periodo	0,596
Duración de la Fase EPC + Arranque de Planta	Periodo	2,596

Porcentaje de Capital de Trabajo	%/periodo	5
Cargos por Operación	%/periodo	25
Costo Total del Proyecto	Costo	\$ 7.050.000
Costo Total por Materia Prima	Costo/periodo	\$ 2.870.000
Venta Total de Producto	Costo/periodo	\$ 12.207.000
Costo de Mantenimiento y Labor Operativo	Costo/periodo	\$ 900.000
Costo por Utilidades	Costo/periodo	\$ 27.000
Tasa de retorno deseada/ Tasa de Interés	%/periodo	20
P.O. Periodo	Año	8,244

Sin embargo los altos costos de capital inicial y los bajos precios preestablecidos de venta de antioxidante, prolongan el tiempo de recuperación de la inversión a 8 años aproximadamente (Tabla 29). Del mismo modo, durante el diseño no se consideró el previo tratamiento de la cáscara de la semilla del cacao para la separación de la grasa, la cual afecta al final de proceso y además aumentan los costos de producción y capital inicial que deben ser invertidos. De acuerdo a esto la TIR puede disminuir respecto al valor obtenido en esta simulación. Sin embargo, con un adecuado proceso de optimización del proceso de producción y considerando que los costos de antioxidantes en el mercado actual son 4 veces mayor a los establecidos en la evaluación económica, se pueden compensar los costos que implican los factores mencionados.

La Tabla 30 indica los costos por materia prima, los datos muestran que el etanol representa el principal costo por materia prima, por lo que es una variable a optimizar y continuar evaluando su impacto sobre el proceso de producción. Así mismo, la Tabla 31 indica los costos por equipos e instalación en donde gran parte de los costos vienen representados en los compresores recíprocos, esto se debe a las altas presiones a las que debe ser sometida el gas para alcanzar las condiciones de operación del proceso.

Tabla 30. Costos de las Corrientes del Proceso. Tomado de los resultados arrojados por el *software* Aspen Hysys.

Descripción	Flujo	Unid	Costo USD/Hr
Costo de Servicios Industriales			
Electricidad	53,17	KW	3,063
Materia Prima			
Alimentación CO2	22,770	LB	16,001
Alimentación Etanol	9,794	LB	6,397
Productos			

Extracto antioxidante	7,675	LB	1392,50
-----------------------	-------	----	---------

Los resultados indican que la técnica de extracción supercrítica es un proceso que, por los actuales costos de antioxidantes y por su carácter *verde*, pueden obtenerse ganancias. Ésta, es una técnica viable, por ser capaz de extraer antioxidantes de la cascarilla de cacao y puede ser económicamente rentable, por poseer beneficios mayores a largo plazo (Tabla 28). Sin embargo, debido a que el disolvente tuvo efecto significativo sobre el CTF, se deberían explorar técnicas para recuperar los disolventes empleados, u otras técnicas de extracción (p.e. solido-liquido, fluidos presurizados, membranas de separación). Todos estos procesos al usar como disolvente el etanol, probablemente aumenten la capacidad de extracción de fenoles. Finalmente, a todos estos procesos se les debe realizar un análisis de impacto ambiental para estimar la magnitud del efectos que pueda tener con el medio ambiente.

Tabla 31. Costos de Equipos. Tomado de los resultados arrojados por el *software* Aspen Hysys.

	Costo Directo (USD)	Costo por instalación (USD)	Peso del Equipo LBS	Peso de Equipo Instalado LBS
Vasija de separación V-100	\$ 53.100	\$ 149.300	18200	30192
Compresor K-100	\$ 852.900	\$ 966.400	12700	23264
Compresor K-101	\$ 866.700	\$ 991.200	12700	23910
Bomba P-100	\$ 94.300	\$ 122.300	5700	7718

CONCLUSIONES

El análisis proximal de la cáscara de la semilla de cacao presentó valores similares a los reportados para cáscaras de otras regiones. Así mismo, se obtuvieron valores muy similares de CTF con respecto a los reportados para muestras de Venezuela y Ecuador.

Fue posible obtener extractos con actividad antioxidante, a partir de la cáscara de la semilla del cacao mediante extracción soxhlet a presión reducida y extracción con CO₂ supercrítico con EtOH como cosolvente a través de los resultados obtenidos con DPPH y ensayo con aceites.

Al realizar EFS (CO₂ supercrítico con EtOH), la presión favoreció la penetración de los solventes en la matriz, mientras que el uso de cosolvente mejoró la afinidad hacia estos compuestos por su mayor polaridad indicado en los efectos proporcionales sobre el contenido total de polifenoles y el rendimiento total respectivamente. Mediante el análisis de superficie de respuesta fue posible determinar como condiciones óptimas de extracción a 60°C una presión de 251 bar y 22% de etanol, obteniendo un valor máximo de CTF de 1,411 mg-eq AG/g de cascarilla y un rendimiento del 5,9%.

Los extractos con mayor CTF y mejor actividad antioxidante fueron los extractos soxhlet AcOEt-EtOH y EtOH y los extractos supercríticos 4 (270 bar y 15% EtOH) y 6 (250 bar y 20% EtOH), el etanol fue la variable que más influyó sobre las respuestas debido a su afinidad polar con los compuestos fenólicos con mejor actividad presentes dentro de la matriz. De igual forma, se encontró que existe una correlación lineal entre el CTF y la actividad antioxidante de los extractos obtenidos, esta relación se debió a que estos compuestos ejercen una acción a través del rompimiento de la reacción de oxidación por la donación de hidrógeno a los radicales libres. La evaluación económica realizada indicó que el proceso de obtención de polifenoles permite recuperar el dinero invertido en los primeros ocho años, y tiene una tasa interna de retorno mayor al 20% establecido. Sin embargo, el capital inicial fue muy alto, los costos de los equipos que deben ser usados y el tipo de material empleado aumentaron estos valores, por lo que son factores que deben ser considerados al invertir en el proyecto.

RECOMENDACIONES

Se recomienda ensayar otros métodos de extracción no convencionales como los que utilizan fluidos presurizados, mediante el uso acetato de etilo y luego etanol, o únicamente etanol como solvente, analizando los efectos de la presión, la temperatura y el tamaño de partícula. Así mismo, se recomienda realizar una extracción supercrítica a las condiciones de extracción óptimas de acuerdo al análisis de superficie de respuesta realizado con el fin de medir la actividad antioxidante del extracto obtenido para comparar con los resultados encontrados para el extracto AcOEt-EtOH y el modelo estadístico.

Se recomienda usar un extractor de mayor capacidad, con el fin de obtener mayores cantidades de extracto y poder diferenciar de mejor forma los rendimientos obtenidos, así como usar un recipiente de gran tamaño para la recepción de extracto, esto con el fin de disminuir la pérdida de analitos durante el proceso de extracción.

Se recomienda un fraccionamiento y posterior perfil cromatográfica de los extractos más activos para identificar los compuestos responsables de la actividad antioxidante.

Se recomienda realizar una prueba de inocuidad de los extractos en el aceite para evaluar si es factible utilizarlos como reemplazo de los antioxidantes comerciales en alimentos y una prueba de análisis sensorial para evaluar si los extractos cambian el sabor y/o apariencia de productos alimenticios, así como reconstituir los extractos en etanol u otro tipo de solvente GRAS para futuras aplicaciones en alimentos.

Se recomienda evaluar el potencial económico y caracterización de la fase grasa obtenida en los extractos para su posible aprovechamiento en la industria.

Para futuras investigaciones, puede realizarse un estudio sinérgico entre los extractos obtenidos y los antioxidantes comerciales con el fin de evaluar el efecto que tendría la combinación de estas dos sustancias en el índice de protección a la oxidación. De igual forma, se recomienda utilizar otros patrones como el BHT y BHA, ampliamente utilizados en la industria alimenticia, para la prueba de oxidación de aceite con el fin de comparar su inhibición con los extractos obtenidos.

REFERENCIAS

- Abarca, D., Martínez, R., Muñoz, J., Torres, M., & Vargas, G. (2010). Residuos de Café, Cacao y Cladodio de Tuna: Fuentes Promisorias de Fibra Dietaria. *Revista Tecnológica ESPOL*, 23(2), 63-69.
- Ahmad, F., Wan Daud, W. M., Ahmad, M. A., & Radzi, R. (2012). Cocoa (Theobroma Cacao) shell-based activated carbon by CO₂ activation in removing of Cationic dye from aqueous solution: Kinetics and equilibrium studies. *Chemical Engineering Research and Design*, 90, 1480-1490. doi:10.1016/j.cherd.2012.01.017
- AOAC International. (1997). Método 985.29. En *Official Methods of Analysis of AOAC International* (16 ed., Vol. II).
- AOAC International. (2000). AOAC Official Method 931.04. Moisture in Cacao Products. Gravimetric method. En *Official Method of Analysis of AOAC International*. Maryland: 17° Edición.
- AOAC International. (2000). AOAC Official Method 970.20. Cacao products. Preparation of Laboratory Sample. En *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Maryland: 17° Edición.
- AOAC International. (2000). AOAC Official Method 970.22. Nitrogen (total) in cacao products. En *Official methods of analysis of AOAC International*. Maryland: 17° Edición.
- AOAC International. (2000). AOAC Official Method 985.04. Nitrogen (total) in fertilizers. Kjeldahl Method. En *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Maryland: 17° Edición.
- AOAC International. (2000). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Maryland: 17° Edición.
- Arenas Sosa, I., & López Sánchez, J. L. (2004). *Espectrofotometría de Absorción. Curso: Métodos de Laboratorio*. Guía de clase, Universidad Autónoma de México, Maestría en Ciencias Bioquímicas.

- Arlorio, M., Coisson, J. D., Travaglia, F., Varsaldi, F., Miglio, G., Lombardi, G., & Martelli, A. (2005). Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. *Food Research International*, 38, 1009-1014.
- Arlorio, M., Coisson, J., Restani, P., & Martelli, A. (2001). Characterization of pectins and some secondary compounds from *Theobroma cacao* hulls. *Food Chemistry and Toxicology*, 66(5), 653-656.
- Asep, E. K., Jinap, S., Tan, T. J., Russly, A. R., Harcharan, S., & Nazimah, S. A. (2008). The effects of particle size, fermentation and roasting of cocoa nibs on supercritical fluid extraction of cocoa butter. *Journal of Food Engineering*, 85, 450-458. doi:10.1016/j.jfoodeng.2007.08.008
- Asep, E., Jinap, S., Jahurul, M., Zaidul, I., & Singh, H. (2013). Effects of polar cosolvents on cocoa butter extraction using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 20, 152-160. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.06.010>
- Azizah, O., Amin, I., Nawalyah, A. G., & Adenanb, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 1523-1530. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.021
- Bailey, A. E. (1984). *Aceites y grasas industriales* (Segunda ed.). Editorial Reverté.
- Bailey, K. C. (1937). *The Retardation of Chemical Reactions*. Londres: Edward Arnold Co.
- Battegazzore, D., Bocchini, S., Alongi, J., & Frache, A. (2014). Plasticizers, antioxidants and reinforcement fillers from hazelnut skin and cocoa by-products: Extraction and use in PLA and PP. *Polymer degradation and stability*, 108, 297-306. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.03.003
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25-30. doi:0023-6438/95/010025

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Bruna, C., Eichholz, I., Rohn, S., Kroh, L., & Huyskens-Keil, S. (2009). Bioactive compounds and antioxidant activity of cocoa hulls (*Theobroma cacao* L.) from different origins. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83, 9-13.
- Cabezas, C., & Bolaños, G. (2013). A pilot plant for the supercritical fluid extraction of cocoa butter from cocoa powder. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, (pág. 1). Cartagena de Indias.
- Camel, V. (2013). Environmental applications: Supercritical fluids. *Reference module in chemistry, Molecular Science and Chemical Engineering*.
- Cantero, D. A., Bermejo, M. D., & Cocero, M. J. (2013). High glucose selectivity in pressurized water hydrolysis of cellulose using ultra-fast reactors. *Bioresource Technology*, 135, 697–703. doi:10.1016/j.biortech.2012.09.035
- Carrillo, L. C., Londoño-Londoño, J., & Gil, A. (2014). Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Research International*, 60, 273-280. doi:10.1016/j.foodres.2013.06.019
- Casa Luker. (10 de Febrero de 2015). *Discurso presentado en las instalaciones de Casa Luker durante una visita técnica*. Bogotá D. C., Colombia.
- Chevreul, A. (1856). *Chemical Physics*. 47, 209.
- Cocero, M. J. (2013). Process Intensification by Supercritical Water. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, (págs. K-3). Cartagena de Indias.
- Code of Federal Regulations. Food And Drug Administration. (1 de Abril de 2014). Direct food substances affirmed as Generally Recognized As Safe. *21CFR 184.1293*.
- Code of Federal Regulations. Food and Drug Administration. (1 de Abril de 2014). Food for human consumption. Part 170 Food Aditives. *21CFR170*. Obtenido de <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=170&showfr=1&subpartnode=21:3.0.1.1.1.1>

- CONABIO. (2014). *Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad*. Recuperado el 4 de Febrero de 2014, de CONABIO: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68-sterc03m.pdf
- Correa Soto, C. E., & Gaviria Mendoza, A. (2010). *Evaluación de la capacidad antioxidante y actividad antitopoisomerasa I y/o II sobre cepas mutadas de Saccharomyces Cerevisiae de plantas de la ecorregión cafetera colombiana*. Trabajo de grado, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología, Pereira.
- Cuéllar, O., & Guerrero, G. (2012). Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, *Theobroma cacao* L. *Revista MVZ Córdoba*, 17, 3176-3183.
- Da Porto, C., Decorti, D., & Natolino, A. (2014). Water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc: A comparison and a proposal. *Journal of Supercritical Fluids*, 87, 1-8. doi:10.1016/j.supflu.2013.12.019
- Del Valle, J. M. (2013). Supercritical CO₂ extraction of biological substrates: From the laboratory to the industrial application. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, (págs. K-5). Cartagena de Indias.
- Dorenkott, M. R., Griffin, L. E., Goodrich, K. M., Thompson-Witrick, K. A., Fundaro, G., Ye, L., . . . Neilson, A. P. (2014). Oligomeric Cocoa Procyanidins Possess Enhanced Bioactivity Compared to Monomeric and Polymeric Cocoa Procyanidins for Preventing the Development of Obesity, Insulin Resistance, and Impaired Glucose Tolerance during High-Fat Feeding. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 62(10), 2216-2227. doi:10.1021/jf500333y
- Espinal, M., Olaya, J., Restrepo, P., Silva, K., & Parada, F. (2010). La guayaba, fuente de fenoles con actividad antioxidante. En *Desarrollo de productos funcionales promisorios a partir de la guayaba (Psidium guajava L.) para el fortalecimiento de la cadena productiva* (págs. 177-185). Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Fedecacao. (2009). Producción de energía verde. *Colombia cacaotera*, 6, 3.

- GSFA . (2014). *Información sobre el aditivo alimentario TBHQ (Terbutil Hidroxiquinona)*.
Obtenido de GSFA Online:
<http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/additives/details.html?id=190>
- Gutierrez Avella, D. M., Ortiz García, C. A., & Mendoza Cisneros, A. (2008). Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. *Simposio de Metrología*. Santiago de Querétaro.
- Hammerstone, J., Lazarus, S. A., Rucker, R., & Schmitz, H. H. (2000). Procyanidin content and variation in some commonly consumed foods. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2086S-2092S.
- Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibañez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136 -148. doi:10.1016/j.foodchem.2005.05.058
- Ibañez, E. (2013). Green process to extract bioactives from natural sources. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, (págs. K-6).
- ICA. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo del cacao. Medidas para la temporada invernal*. Bogotá: Produmedios. Obtenido de <http://www.ica.gov.co/getattachment/c01fa43b-cf48-497a-aa7f-51e6da3f7e96/-nbsp;M;anejo-fitosanitario-del-cultivo-de-Cacao.aspx>
- Infocalidad. (25 de Septiembre de 2013). *Biorrefinerías: sostenibilidad en los procesos industriales*. Obtenido de Infocalidad: <http://www.infocalidad.net/archives/opinion/biorrefinerias-sostenibilidad-en-los-procesos-industriales>
- International Cocoa Organization. (3 de Julio de 2003). *FAQ- Products that can be made from cocoa*. Obtenido de International cocoa organization website: <http://www.icco.org/faq/52-by-products/115-products-that-can-be-made-from-cocoa.html>

- Irianda, P. G., & Benedito, J. J. (2007). *Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano obtenidos mediante fluidos supercríticos*. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. Obtenido de <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13703/Capacidad%20antimicrobiana%20y%20antioxidante%20de%20extractos%20de%20or%C3%A9gano%20obtenidos%20mediante%20fluidos%20supercr%C3%ADticos.pdf?sequence=1>
- Jiménez, S. (2014). *Agencias de Noticias*. Recuperado el 10 de Junio de 2014, de Sitio web de la agencia de noticias de la Universidad Nacional: <http://www.agenciadenoticias.unal.edu.co/ndetalle/article/en-la-un-se-hornea-una-golosina-light.html>
- King, J. W. (2013). Supercritical Fluid Extraction at High Pressures (>700 Bar): Theoretical considerations and practical applications. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, (págs. K-2). Cartagena de Indias.
- Lafont, J. J., Durango, L. C., & Aramendiz, H. (2014). Estudio químico del aceite obtenido a partir de siete variedades de soya (*Glycinemax L.*). *Información tecnológica*, 25(2), 79-86. doi:10.4067/S0718-07642014000200009
- Lange, H., & Fincke, A. (1970). Kakao und schokolade. En *Handbuch der Lebensmittel Band VI: Alkaloidhaltige Genussmitte* (págs. 210-309). Heidelberg, Alemania.
- Levine, I. (2004). Gases Reales. En I. N. Levine, *FISICOQUÍMICA* (págs. 285-291). Madrid: Edigrafos.
- Locatelli, M., Travaglia, F., Giovannelli, L., Coisson, J. D., Bordiga, M., Pattarino, F., & Arlorio, M. (2013). Clovamide and phenolics from cocoa beans (*Theobroma cacao L.*) inhibit lipid peroxidation in liposomal systems. *Food Research International*, 50(1), 129-134. doi:10.1016/j.foodres.2012.10.008
- Luque de Castro, M. D., Valcárcel, M., & Tena, M. T. (1993). *Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico*. Barcelona: Editorial Reverté S. A.

- Martínez Ávila, O. M., Sánchez Castellanos, F. J., & Suárez Palacios, O. Y. (2007). Producción de ésteres etílicos a partir de aceite de palma RBD. *Revista Ingeniería e Investigación*, 27(2), 34-43.
- Martínez, G., Hernández, R., & Díaz, M. (2005). Determinación de hidroperóxidos totales en aceite de girasol ozonizado mediante el método de oxidación ferrosa en xilenol naranja. *Grasas y Aceites*, 56(2), 147-152.
- Martínez, R., Torres, P., Meneses, M., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39-45. doi:10.1016/j.foodres.2012.08.005
- Mckay, D., & Blumberg, J. (2002). The role of tea in human health: an update. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(1), 1- 13. doi:10.1080/07315724.2002.10719187
- Ministerio de Agricultura. (2013). *Noticias: Minagricultura anuncia plan estratégico para incrementarr la producción cacaotera colombiana*. Recuperado el 11 de Junio de 2013, de Ministerio de Agricultura de Colombia: <http://www.minagricultura.gov.co/inicio/noticias.aspx?idNoticia=1127>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (2012). *Plan Nacional de Desarrollo Cacaotero 2012-2021*.
- Ministerio de la Protección Social de Colombia. (2012). Resolución. Lista positiva de aditivos. *Por medio de la cual se establece el reglamento técnico sobre la lista positiva de aditivos permitidos que se fabriquen procesen, envasen, almacenen transporten, expendan, importen, comercialicen y se utilicen en alimentos y bebidas alcohólicas*. Bogotá, Colombia. Obtenido de http://www.minsalud.gov.co/Normatividad_Nuevo/Proyecto%20de%20Resoluci%C3%B3n%20lista%20positiva%20de%20aditivos.pdf#search=antioxidante
- Ministerio de Salud de Colombia. (15 de Abril de 1991). Resolución número 4124 de 1991. "por lo cual se reglamenta el Título V Alimentos, de la ley 09 de 1979, en cuanto concierne a los ANTIOXIDANTES que se pueden utilizar en alimentos. Bogotá,

- Colombia. Obtenido de https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion_4124_1991.pdf
- Molan, A. L., De, S., & Meagher, L. (2009). Antioxidant activity and polyphenol content of green tea flavan-3-ols and oligomeric proanthocyanidins. *International journal of food sciences and nutrition*, 60(6), 497-506. doi:10.1080/09637480701781490
- Molienda Perú. (2012). *Cascarilla de cacao*. Recuperado el 15 de noviembre de 2013, de Molienda de harina y especias: <http://moliendadeharinasyespecias.com/productos/cascarilla-de-cacao.html>
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin journal of science and technology*, 26(2), 211-219.
- Moncada Botero, J. (2012). *Design and evaluation of sustainable biorefineries from feedstocks in tropical regions*. Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ingeniería Química.
- Moraes, M. N., Zobot, G. L., & Meireles, M. A. (2013). Applications of Supercritical Fluids in Latin America: Past, Present, and Future Trends. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids*, (págs. K-1). Cartagena de Indias.
- Moureu, C., & Dufraisse, C. (1926). Catalysis and Auto-Oxidation. Anti-Oxygenic and Pro-Oxygenic Activity. *Chemical Reviews*, 3(2), 113 - 162. doi:10.1021/cr60010a001
- Murillo-Crespo, I. G. (2008). *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*. Recuperado el 24 de Junio de 2013, de Centro de Información Bibliotecario de la Escuela Superior Politécnica del Litoral: http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/REVISTA_CICYT/Articulo/74.pdf
- Niemenak, N., Rohsius, C., Elwers, S., Omokolo Ndoumou, D., & Lieberei, R. (2006). Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao L.*) clones in terms of their

- phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 612-619. doi:10.1016/j.jfca.2005.02.006
- Nourooz-Zadeh, J., Tajaddini-Sarmadi, J., Birlouez-Aragon, I., & Wolff, S. (1995). Measurement of Hydroperoxides in Edible Oils using the Ferrous Oxidation in Xylenol orange assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 17-21.
- Padilla, A. M.-R. (2008). *Contenido de polifenoles y actividad antioxidante*. Caracas, Venezuela.
- Palomino, L. R., García, C. M., Gil, J. H., Rojano, B. A., & Durango, D. L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae, revista de la facultad de química farmacéutica*, 16(3), 388-395.
- Peralta-Bohórquez, A., Reyes, A., Rangel-Mendoza, J. A., Nivia-Quintero, A., Mendoza-Garzón, A. A., Rodríguez-Varela, L. I., & Parada-Alfonso, F. (2008). Diseño y construcción de equipos de extracción con fluidos supercríticos (EFS) y algunas aplicaciones en análisis de alimentos. *Alimentos hoy*, 13(13), 10-17.
- Perea-Villamil, J. A., Cadena-Cala, T., & Herrera-Ardila, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(2), 128-134.
- Prado, J. M., Dalmolin, I., Carareto, N. D., Basso, R. C., Meirelles, A. J., Oliveira, J. V., . . . Meireles, M. A. (2012). Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Ingeniering*, 109(2), 249-257. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.10.007
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 4290-4302. doi:10.1021/jf0502698
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospilataria*, 27(1), 76-89. doi:10.3305/nh.2012.27.1.5418

- Rius Casanovas, J. (1997). *Barcelona Patente n° ES2099676*.
- Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., & Cocero, M. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 98-103. doi:10.1016/j.jfoodeng.2011.09.029
- Salajegheh, D., Vaziri, A., & Bastani, D. (2013). Supercritical Extraction of cocoa butter from cocoa seed, using pure Carbon Dioxide, Carbon Dioxide with Ethanol as co-solvent and ethane. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 13(8), 1010-1015. doi:10.5829/idosi.mejsr.2013.13.8.3763
- Saldaña, M. (2013). The use of pressurized fluids: from extraction to synthesis. *III Iberoamerican Conference in Supercritical fluids*, (págs. K-7). Cartagena de Indias.
- Sandoval, H. (2011). Colombia quiere cacao. *El Espectador*. Recuperado el 11 de junio de 2013, de <http://www.elespectador.com/impreso/negocios/articulo-298549-colombia-quiere-cacao>
- Sarmiento, L. A., Machado, R. A., Petrus, J., Tamanini, T. R., & Bolzan, A. (2008). Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration. *Journal of Supercritical Fluids*, 45(1), 64–69. doi:10.1016/j.supflu.2007.11.007
- Saval, S. (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.
- Schaich, K. M. (2005). Lipid Oxidation: Theoretical Aspects. En F. Shahidi, *Bailey's Industrial Oil & Fat Products* (págs. 269 - 243). New Jersey.
- Scott. (1865). Atmospheric Oxidation and Antioxidants. En S. G., *Atmospheric Oxidation and Antioxidants* (págs. pp 1 - 15). Londres: Elsevier.
- Scrimgeour, C. (2005). Chemistry of Fatty Acids. En F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Six volume set* (Sexta edición ed., Vol. 1, págs. 1-43). John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/047167849X
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement Methods. En F. Shahidi (Ed.), *Bailey's industrial oil and fat products. Six volume set* (Sexta ed., Vol. 1, págs. 357-385). John Wiley & Sons, Inc.

- Silva-Chandía, S. P. (2012). *Optimización del proceso de extracción supercrítico de los polifenoles de la vaina de Tara (Caesalpinia spinosa)*. Recuperado el 15 de Febrero de 2014, de Portal de Tesis electrónicas de la Universidad de Chile: <http://www.tesis.uchile.cl/handle/2250/111202>
- Skoog, D. A. (2005). Espectrometría Infrarroja. En D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, & S. R. Crouch, *Fundamentos de Química analítica* (Vol. 8, pág. 795). Mexico: Thomsom Learning.
- Soto Pereira, M. J. (2012). *Desarrollo del proceso de producción de cascarilla de semilla de cacao en polvo destinada al consumo humano*. Proyecto de Grado, Universidad Simón Bolívar, Ingeniería Química. Obtenido de <http://159.90.80.55/tesis/000155680.pdf>
- Suárez Rozo, D. L., & Orozco Giraldo, D. M. (2014). *Obtención y caracterización de pectina a partir de la cascarilla de cacao del Theobroma cacao L., subproducto de una industria chocolatera nacional*. Universidad Tecnológica de Pereira, Escuela de Química. Obtenido de [http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/4892/1/54384\\$939.pdf](http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/4892/1/54384$939.pdf)
- Sunarso, J., & Ismadji, S. (2009). Decontamination of hazardous substances from solid matrices and liquids using supercritical fluids extraction: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 161(1), 1–20. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.03.069
- Teng-ju, T., Selamat, J., Asep, E., & Nazimah, A. (2008). Extraction of cocoa butter by supercritical carbon dioxide: Optimization of operating conditions and effect of particle size. *Journal of Food Lipids*, 15, 263-276.
- Universidad Miguel Hernández de Elche. (22 de Mayo de 2015). *Transmitancia, absorbancia y ley de Lambert-Beer*. Obtenido de Repositorio innovación UMH: [Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_05.htm](http://repositorio.innovacion.umh.es/Proyectos/P_22CursoMateriales/Miguel_Angel_Sogorb/Wimba/Espectroscopia_05.htm)
- Universita Alicante. (2014). Investigadores de la UA obtienen carbón activado a partir de cascarilla de cacao. *Actualidad Universitaria*.

- Valverde-García, A. (1995). *Extracción con Fluidos Supercríticos: Principios y Aplicaciones al análisis de residuos de plaguicidas*. Recuperado el 24 de Febrero de 2014, de Sitio web de la Diputación de Almería: [http://www.dipalme.org/Servicios/Anexos/anexosiea.nsf/VAnexos/IEA-RP-c6/\\$File/RP-c6.pdf](http://www.dipalme.org/Servicios/Anexos/anexosiea.nsf/VAnexos/IEA-RP-c6/$File/RP-c6.pdf)
- Vázquez, L. (2008). *Extracción con fluidos supercríticos y síntesis enzimática para la obtención de lípidos funcionales*. Recuperado el 24 de Febrero de 2014, de Repositorio de la Universidad Autónoma de Madrid: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1830/5441_vazquez_frutos_luis.pdf?sequence=1
- Velasco, R. J., Villada, H. S., & Carrera, J. E. (2007). Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 53 - 66.
- Wanasundara, P., & Shahidi, F. (2005). Antioxidants: Science, Technology, and Applications. En F. Shahidi, *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (Sexta Edición ed., págs. 431-484). Canada: John Wiley & Sons, Inc.
- Weize, W., Wenjing, L., Buxing, H., Tao, J., Dong, S., Zhaofu, Z., . . . Bo, W. (2004). Effect of organic cosolvents on the solubility of ionic liquid in supercritical CO₂. *Journal of chemical engineering data*, 49(6), 1597-1601.
- Wisniak, J. (2010). The History of Catalysis. From the beginning to nobel prizes. *Educación Química*, 21(1), 60-69.
- Wollgast, J., & Anklam, E. (2000). Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33(6), 423-447. doi:10.1016/S0963-9969(00)00068-5
- Wood, J. E., Senthilmohan, S. T., & Peskin, A. V. (2002). Antioxidant activity of procyanidin-containing plant extracts at different pHs. *Food Chemistry*, 77, 155-161. doi:10.1016/S0308-8146(01)00329-6

World Cocoa Foundation. (2014). *Cocoa value chain*. Recuperado el 15 de Enero de 2014, de World Cocoa Foundation: <http://worldcocoafoundation.org/about-cocoa/cocoa-value-chain/>

Zapata-Bustamante, S., Tamayo-Tenorio, A., & Rojano, B. A. (2013). Efecto de la fermentación sobre la actividad antioxidante de diferentes clones de cacao colombiano. *Revista cubana de plantas medicinales*, 18(3), 391-404.

Zumbé, A. (1998). Polyphenols in cocoa: are there health benefits? *BNF nutrition bulletin*, 23.

ANEXOS

ANEXO A.

MÉTODOS DE ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Tabla 32. Métodos, pruebas y unidades para expresar resultados en la determinación de actividad antioxidante. Adaptado.

(Wanasundara & Shahidi, 2005).

Método/prueba	Medidas	Resultados y Unidades
Oxidación de sustrato o formación de producto		
Método de oxígeno activo	Cambios de masa, índices de peróxidos o hidroperóxidos, dienos conjugados, sustancias reactivas al ácido <i>2-tiobarbitúrico</i> , valor de anisidina, formación de hexanal, etano o pentano.	Periodo de inducción (h, d)
Prueba de almacenamiento en horno		Tiempo hasta, llegar a un nivel conjunto de oxidación durante pre-inducción (h, d)
Prueba de almacenamiento en estante		Tasa de oxidación durante periodo de pre inducción ($\text{mol h}^{-1} \text{Kg}^{-1}$, $\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$) Concentración necesaria para producir un efecto equivalente a la referencia antioxidante durante periodo de pre inducción (mol Kg^{-1} , g, L^{-1}) Concentración de un grupo funcional luego de un tiempo establecido (mol Kg^{-1} , g, L^{-1}) Concentración de un producto de oxidación después de un tiempo establecido (mg Kg ppm p/p) Lectura de una escala después de un periodo de tiempo establecido (Conductividad, absorbancia, etc.)
Captura de radicales libres o supresión de la formación		
Ensayo - desactivación DPPH	Capacidad para desactivar el radical DPPH en la solución.	Porcentaje de inhibición, EC_{50} (Concentración del compuesto prueba requerido para decrecer la concentración de la prueba de radical libre al 50%)
Ensayo - desactivación radical hidroxilo	Capacidad para desactivar radicales hidroxilos generados en un sistema modelo	$\text{T}_{\text{EC}_{50}}$ (tiempo de disminución de la concentración de prueba de radicales libres al 50 %)
Ensayo - desactivar radical superóxido	Capacidad para desactivar radicales superóxidos generados en un modelo sistema.	
Resonancia electrónica paramagnética (EPR) Espectrometría/ prueba de capturas giro	Detecta radicales libres involucrados en la autooxidación y procesos relacionados.	Intensidad o rata de cambio señal EPR

Poder de antioxidante de reducción férrica	Medida espectrofotométrica del Fe (II) complejo formado debido a la reducción de la capacidad de los compuestos de ensayo.	Cambio en la absorbancia
Capacidad de adsorción de radicales de oxígeno	Ensayo basado en ficoeritrina	Intensidad fluorescente, μmol of Trolox equivalentes
Parámetro antioxidante del total de radical-capturado	Medida del consumo de oxígeno durante la oxidación controlada del lípido inducida por descomposición térmica de 2,2'azobis(2-aminopropano) clorhidrato; AAPH	μmol desactivados radicales peróxido L^{-1}
Capacidad antioxidante de equivalente Trolox	Basado en la inhibición de producción 2,2' Azinobis (3- etilbenzotiazolina) – 6 – ácido sulfónico; ABTS catión radical y mM concentración de solución Trolox teniendo una capacidad antioxidante equivalente a 1.0 mM solución de una prueba de sustancia.	mM L^{-1} Trolox equivalentes

ANEXO B.

ESPECTROMETRÍA

Ley de Lambert-Beer

La ley de Lambert-Beer establece que la absorbancia está directamente relacionada con las propiedades intrínsecas del analito, con su concentración y con la longitud de la trayectoria del haz de radiación al atravesar la muestra (Universidad Miguel Hernández de Elche, 2015). La expresión matemática de la ley de Lambert-Beer es:

$$A = C \cdot \epsilon \cdot L$$

donde:

A = Absorbancia de la muestra

C = Concentración del cromóforo

L = Longitud del paso óptico que contiene la muestra

ϵ = Absorptividad molar.

Instrumentación

Espectrofotómetro

El espectrofotómetro es el nombre genérico de todos los aparatos basados en esta técnica. El espectrofotómetro puede estar equipado con un sólo detector o un detector multicanal, configurados por medidas con un solo rayo (SB) o doble rayo (DB) y designados para la medición de una longitud fija o para adquirir una espectro de absorción completo.

Detectores

Espectrofotometría infrarroja

La espectrofotometría infrarroja es una herramienta poderosa para identificar compuestos orgánicos e inorgánicos puros porque, con excepción de unas cuantas moléculas

homonucleares, las especies moleculares adsorben radiación infrarroja. En los laboratorios modernos existen tres tipos de instrumentos de infrarrojo: espectrómetros de dispersión, de transformada de Fourier (FTIR) y fotómetros de filtro. Los dos primeros se utilizan para obtener espectros completos en identificaciones cualitativas, mientras que los fotómetros de filtro están diseñados para tareas cuantitativas (Skoog, 2005).

UV-VIS (Espectroscopía ultravioleta visible)

La espectroscopía UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 160 y 780 nm) por una molécula. La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado. Los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. Debido a ello, la espectroscopia UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula. Las bandas que aparecen en un espectro UV-Vis son anchas debido a la superposición de transiciones vibracionales y electrónicas.

ANEXO C.

MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.8. Elementos de inferencia estadística

6.8.1. El p-valor

El *p-valor* es una medida directa de lo verosímil que resulta obtener una muestra como la actual si es cierto H_0 . Los valores pequeños indican que es muy infrecuente obtener una muestra como la actual, en cambio, los valores altos que son frecuente. El *p-valor* se emplea para indicar cuánto (o cuán poco) contradice la muestra actual la hipótesis alternativa. Informar sobre cual es el *p-valor* tiene la ventaja de permitir que cualquiera decida qué hipótesis acepta basándose en su propio nivel de riesgo Alfa (α). Este es el nivel de significancia de la prueba. Esta es la probabilidad máxima que tenemos de equivocarnos al rechazar una hipótesis nula H_0 verdadera. Por eso es que entre más pequeño el valor p (que es la probabilidad de error) más confiable es el resultado de inferencia estadística.

Esto no es posible cuando se informa, como ha sido tradicional, indicando sólo el resultado de la decisión, es decir, si se acepta o se rechaza H_0 con un α fijo.

Al proporcionar el *p-valor* obtenido con la muestra actual, la decisión se hará de acuerdo a la regla siguiente:

Si $p_v \leq \alpha$, aceptar H_1 si $p_v > \alpha$, aceptar H_0

6.8.2. Método de Tukey

Un método más conservador para comparar pares de medias de tratamientos es el *método de Tukey*, el cual consiste en comparar las diferencias entre medias muestrales con el valor crítico dado por:

$$T_\alpha = q_\alpha(k, N - k) \sqrt{\frac{CM_E}{n_i}}$$

Donde CM_E es el cuadrado medio del error, n es el número de observaciones por tratamiento, k es el número de tratamientos, $N - k$ es igual a los grados de libertad para el error, α es el nivel de significancia prefijado y el estadístico $q_\alpha(k, N - k)$ son puntos porcentuales de la

distribución del rango estudentizado, que se obtienen de la correspondiente tabla en el apéndice. Se declaran significativamente diferentes los pares de medias cuya diferencia muestral en valor absoluto sea mayor que T_a . A diferencia de los métodos LSD y Duncan, el método de Tukey trabaja con un error α muy cercano al declarado por el experimentador.

6.8.3. Análisis de varianza (ANOVA)

En ésta se resume el análisis de varianza de un experimento, que sirve para probar las hipótesis de interés. El *análisis de varianza* (ANOVA) es la técnica central en el análisis de datos experimentales. La idea general de esta técnica es separar la variación total en las partes con las que contribuye cada fuente de variación en el experimento. En el caso del diseño Completamente al azar se separan la variabilidad debida a los tratamientos y la debida al error. Cuando la primera predomina “claramente” sobre la segunda, es cuando se concluye que los tratamientos tienen efecto (o dicho de otra manera, las medias son diferentes. Cuando los tratamientos no dominan contribuyen igual o menos que el error, por lo que se concluye que las medias son iguales.

6.8.4. Error estándar de un estadístico

Es la desviación estándar de un estadístico. Mide la variación muestral del mismo.

6.8.5. Diagrama de Pareto de efectos

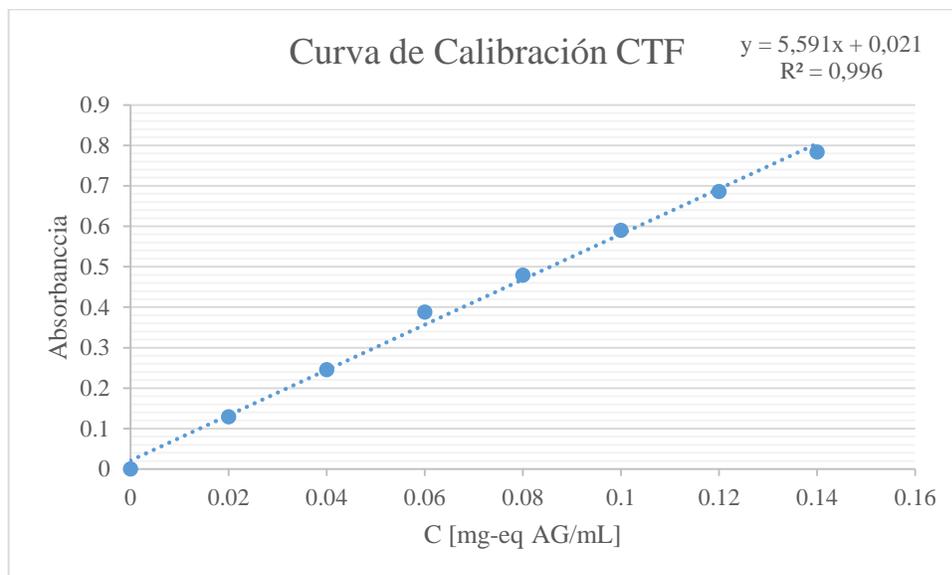
El *diagrama de Pareto* representa de manera descriptiva la realidad observada de los efectos, pero sin considerar supuestos distribucionales. En la gráfica de efectos en papel de probabilidad normal (gráfico de Daniel) es más difícil apreciar la importancia relativa de los efectos, pero es mejor que el Pareto para señalar cuáles efectos son activos. Por ello, lo mejor es utilizar ambas gráficas para decidir cuáles efectos mandar al error.

6.8.6. Superficie de respuesta

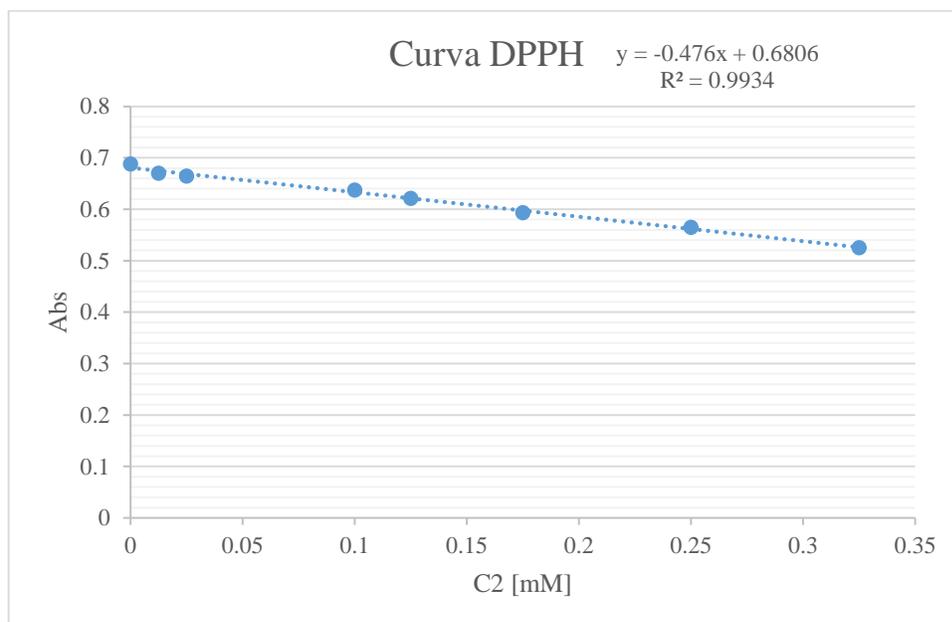
Es la superficie que resulta de representar gráficamente el modelo ajustado, y describe el comportamiento de la respuesta promedio en cada punto de la región experimental.

ANEXO D.

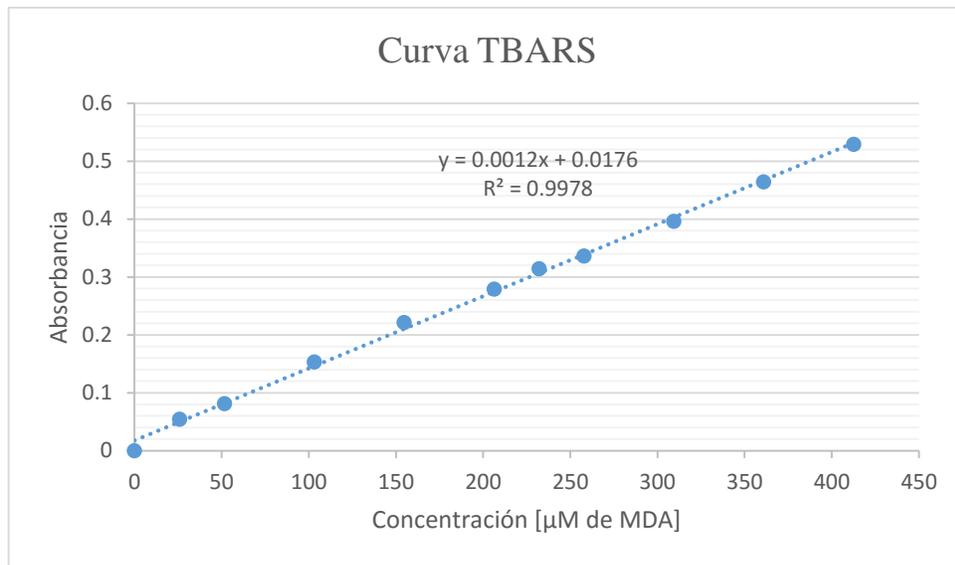
CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA MÉTODOS ANALÍTICOS



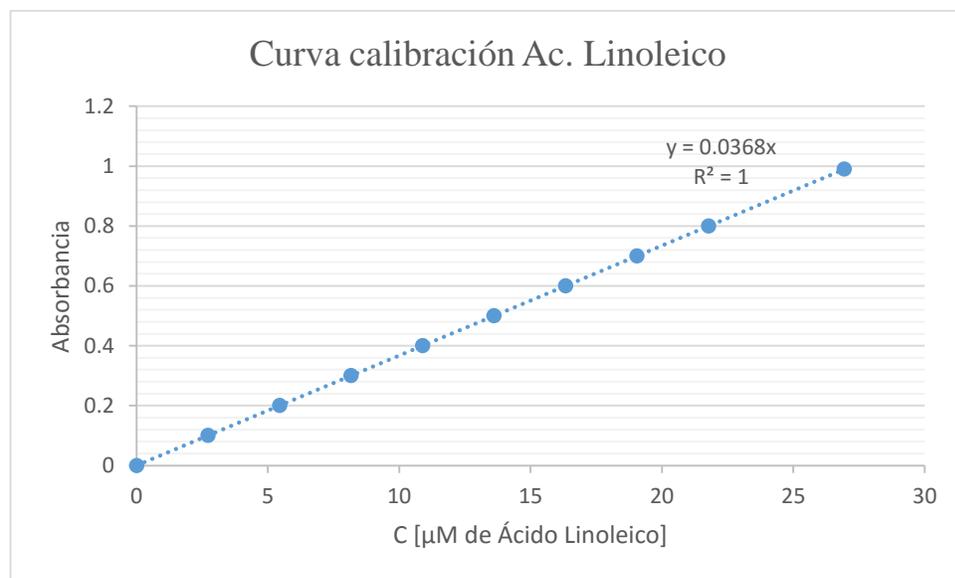
Gráfica 1. Curva de calibración para el contenido total de fenoles. .



Gráfica 2. Curva de calibración para el método de captación del radical libre DPPH. .



Gráfica 3. Curva de calibración de TBARS. .



Gráfica 4. Curva de calibración de HPT. .

ANEXO E
ESPECIFICACIÓN TÉCNICA Y CONDICIONES DE OPERACIÓN DE EQUIPOS
CALCULADOS POR ASPEN HYSYS

Compressor: K-100				
Connections				
Inlet Stream				
STREAM NAME		FROM UNIT OPERATION		
Alimentación CO2				
Outlet Stream				
STREAM NAME		TO UNIT OPERATION		
Dioxido de Carbono		Mixer		Punto de Mezcla
Energy Stream				
STREAM NAME		FROM UNIT OPERATION		
Q-103				
Parameters				
Speed:	0.1033 rpm *	Duty:	1.9477e-01 kW	
Adiabatic Eff.:	75.00 %	PolyTropic Eff.:	77.60	
Adiabatic Head:	5191 m	Polytropic Head:	5371 m	
Adiabatic Fluid Head:	50.91 kJ/kg	Polytropic Fluid Head:	52.67 kJ/kg	
Polytropic Exp.	1.456	Isentropic Exp.	1.326	Poly Head Factor 0.9957
RECIPROCATING SETTINGS				
Number of Cylinders:	1	Cylinder Type:	Single-acting, Outer End	
Bore:	0.2000 m	Stroke:	1.000 m	
Piston Rod Diameter:	2.500e-002 m	Const. Vol. Efficiency Loss:	4.00 %	
Default Fixed Clearance Vol.:	15.00 %	Zero Speed Flow Resistance:	0.0000 kg/hr/sqrt(kPa-kg/m3)	
Typical Design Speed:	---	Volumetric Efficiency:	81.64 %	
Speed:				0.1033 rpm *
		1		
Fixed Clearance Vol. (m3)	4.712e-003			
Variable Clearance Vol. (m3)	0.0000			
Variable Volume Enabled	Off			
Cylinder is unloaded	Off			
Conditions				
Name	Alimentación CO2	Dioxido de Carbono	Q-103	
Vapour	1.0000	1.0000	---	
Temperature (C)	25.0000 *	118.3442	---	
Pressure (kPa)	3039.7499 *	8000.0000 *	---	
Molar Flow (kgmole/h)	0.2347	0.2347	---	
Mass Flow (kg/h)	10.3300 *	10.3300 *	---	
Std Ideal Liq Vol Flow (m3/h)	0.0125	0.0125	---	
Molar Enthalpy (kJ/kgmole)	-3.952e+005	-3.922e+005	---	
Molar Entropy (kJ/kgmole-C)	140.8	142.7	---	
Heat Flow (kJ/h)	-9.2763e+04	-9.2062e+04	7.0117e+02	

Pump: P-100				
CONNECTIONS				
Inlet Stream				
Stream Name	From Unit Operation			
Alimentación de Etanol				
Outlet Stream				
Stream Name	To Unit Operation			
4	Valve			VLV-103
Energy Stream				
Stream Name	From Unit Operation			
Q-102				
PARAMETERS				
Adiabatic Efficiency (%):	75.00	Delta P:	7909 kPa	Duty: 1.620e-002 kW
CURVES				
Delta P:		7909 kPa	Duty:	1.620e-002 kW
Coefficient A:	0.0000	Coefficient B:	0.0000	Coefficient C: 0.0000
Parameter Preferences	Units for Delta P:	m	Flow Basis	ActVolFlow Units for Flow: m3/h
User Variables				
CONDITIONS				
Name	Alimentación de Etanol	4	Q-102	
Vapour	0.0000	0.0000	---	
Temperature (C)	25.0000	28.8401	---	
Pressure (kPa)	101.3250	8010.0000	---	
Molar Flow (kgmole/h)	0.1024	0.1024	---	
Mass Flow (kg/h)	4.4419	4.4419	---	
Std Ideal Liq Vol Flow (m3/h)	0.0055	0.0055	---	
Molar Enthalpy (kJ/kgmole)	-2.788e+005	-2.782e+005	---	
Molar Entropy (kJ/kgmole-C)	-17.34	-37.71	---	
Heat Flow (kJ/h)	-2.8555e+04	-2.8496e+04	5.8330e+01	

Compressor: K-101

Connections

Inlet Stream

STREAM NAME	FROM UNIT OPERATION	
1	Mixer	Punto de Mezcla

Outlet Stream

STREAM NAME	TO UNIT OPERATION	
Mezcla Supercritica	Valve	VLV-100

Energy Stream

STREAM NAME	FROM UNIT OPERATION	
Q-101		

Parameters

Speed:	5.896e-002 rpm ^	Duty:	-2.1922e-01 kW		
Adiabatic Eff.:	75.00	PolyTropic Eff.:	-12.34		
Adiabatic Head:	-4088 m	Polytropic Head:	872.2 m		
Adiabatic Fluid Head:	-40.07 kJ/kg	Polytropic Fluid Head:	8.592 kJ/kg		
Polytropic Exp.	1.506	Isentropic Exp.	1.620	Poly Head Factor	0.1471

RECIPROCATING SETTINGS

Number of Cylinders:	1	Cylinder Type:	Single-acting, Outer End
Bore:	0.2000 m	Stroke:	1.000 m
Piston Rod Diameter:	2.500e-002 m	Const. Vol. Efficiency Loss:	4.00 %
Default Fixed Clearance Vol.:	15.00 %	Zero Speed Flow Resistance:	0.0000 kg/hr/sqrt(kPa-kg/m3)
Typical Design Speed:	---	Volumetric Efficiency:	---
Speed:			5.896e-002 rpm ^

	1			
Fixed Clearance Vol. (m3)	4.712e-003			
Variable Clearance Vol. (m3)	0.0000			
Variable Volume Enabled	Off			
Cylinder is unloaded	Off			

Conditions

Name	1	Mezcla Supercritica	Q-101	
Vapour	0.7164	0.7480	---	
Temperature (C)	67.1728	60.0000 ^	---	
Pressure (kPa)	8000.0000	25000.0000 ^	---	
Molar Flow (kgmole/h)	0.3371	0.3371	---	
Mass Flow (kg/h)	14.7719	14.7719	---	
Std Ideal Liq Vol Flow (m3/h)	0.0181	0.0181	---	
Molar Enthalpy (kJ/kgmole)	-3.578e+005	-3.599e+005	---	
Molar Entropy (kJ/kgmole-C)	92.13	80.88	---	
Heat Flow (kJ/h)	-1.2056e+05	-1.2135e+05	-7.8921e+02	

Separator: V-100

CONNECTIONS

Inlet Stream

Stream Name	From Unit Operation
Mezcla con extracto	Valve: VLV-100

Outlet Stream

Stream Name	To Unit Operation
Descarga de CO2	Valve: VLV-102
Descarga Etanol	Virtual Stream Extn v1.1.2: op-101

Energy Stream

Stream Name	From Unit Operation

PARAMETERS

Vessel Volume:	1.000 m ³	Level SP:	100.00 %	Liquid Volume:	1.000 m ³
Vessel Pressure:	1.300e+004 kPa	Pressure Drop:	2000 kPa	Duty:	0.0000 kJ/h
				Heat Transfer Mode:	Heating

RATING

Sizing

Cylinder	Vertical	Separator has a Boot:	No
Volume:	1.000 m ³	Diameter:	0.9468 m
		Height:	1.420 m

Nozzles

Base Elevation Relative to Ground Level		0.0000 m	Diameter	0.9468 m	Height	1.420
		Mezcla con extracto	Descarga de CO2	Descarga Etanol		
Diameter	(m)	7.101e-002	7.101e-002	7.101e-002		
Elevation (Base)	(m)	0.7101	1.420	0.0000		
Elevation (Ground)	(m)	0.7101	1.420	0.0000		
Elevation (% of Height)	(%)	50.00	100.00	0.00		

Simple Heat Loss Parameters

Overall U (kJ/h-m ² -C)	36.00	Ambient Temperature (C)	25.00	Overall Heat Transfer Area (m ²)	4.225	Heat Flow (kJ/h)	-7673
------------------------------------	-------	-------------------------	-------	--	-------	------------------	-------

Level Taps: Level Tap Specification

Level Tap	PV High	PV Low	OP High	OP Low

Level Taps: Calculated Level Tap Values

Level Tap	Liquid Level	Aqueous Level

Options

PV Work Term Contribution	(%)	100.00
---------------------------	-----	--------

CONDITIONS

Name	Mezcla con extracto	Descarga Etanol	Descarga de CO2	
Vapour	0.7539	0.0000	1.0000	
Temperature	(C) 58.8834	58.7152	75.4542	
Pressure	(kPa) 15000.0000	13000.0000	11000.0000	
Molar Flow	(kgmole/h) 0.3371	0.0811	0.2560	
Mass Flow	(kg/h) 14.7719	3.4819	11.2900	
Std Ideal Liq Vol Flow	(m ³ /h) 0.0181	0.0043	0.0137	
Molar Enthalpy	(kJ/kgmole) -3.599e+005	-2.795e+005	-3.854e+005	
Molar Entropy	(kJ/kgmole-C) 83.75	-13.13	116.2	
Heat Flow	(kJ/h) -1.2135e+05	-2.2682e+04	-9.8868e+04	

GLOSARIO

AUTO-OXIDACIÓN: deterioro oxidativo de los ácidos grasos insaturados a través de un proceso auto-catalítico que consiste en un mecanismo de cadena de radicales libres. Esta cadena incluye iniciación, propagación, y terminación de las reacciones que podrían ser cíclicas una vez iniciadas.

DESECHOS: aquellos materiales que no tienen algún valor comercial, ni poseen atributos de interés para ser utilizados en algún proceso, por lo que se consideran como basura y se les debe dar una disposición final.

GRANZA: residuos que quedan de las semillas después de aventarse y cribarse.

OXÍGENO SINGLETE: nombre común utilizado para las formas energéticamente excitadas del oxígeno molecular (O_2), con dos electrones apareados en los orbitales de energía más alta (orbital antienlazante), $\pi^* 2p$.

QUELANTE: que tiene la propiedad de combinarse con los iones positivos bivalentes y trivalentes, formando complejos estables, desprovistos de toxicidad y eliminables a través de la orina.

SUBPRODUCTO: producto secundario, bien conocido, generalmente útil, comercializable y por lo tanto con valor agregado, que resulta de un proceso industrial

TERMOLÁBIL: material que se destruye al alcanzar una temperatura más o menos elevada.