

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA**

**EVALUACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE
COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA PLACENTA DE CACAO PARA
SU APLICACIÓN COMO POTENCIAL AGENTE INHIBIDOR DEL
PARDEAMIENTO ENZIMÁTICO**

**PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
QUÍMICA**

**IVONNE CAROLINA RIVAS REA
ivonne.rivrea@hotmail.com**

**DIRECTOR: ING. EDWIN VERA CALLE, Ph. D.
edwin.vera@hotmail.com**

Quito, Julio 2016

© Escuela Politécnica Nacional (2016)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Ivonne Carolina Rivas Rea, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Ivonne Rivas

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Ivonne Carolina Rivas Rea, bajo mi supervisión.

Ing. Edwin Vera (Ph. D.)

DIRECTOR DEL PROYECTO

AGRADECIMIENTOS

A Víctor, mi papá, por haber sido un ejemplo de tenacidad y lucha entre adversidades. Por tu confianza en cada paso que he dado y decisión que he tomado. A Doris, mi mamá, por darme todo lo que he necesitado, en infinidad de maneras, aun cuando no lo he merecido. Les doy gracias por todo lo que he recibido de sus manos con mucho cariño y esfuerzo.

A Luis Hernán y Silvia, por su dulzura para formar una familia tan unida y fuerte. Gracias a ti, abuelito, por haber sido el primero en darme impulso en mis locuras de aprender y abrirme camino en el mundo. A Feliciano, por ser un ser humano lleno de tanta bondad y amor, y haber tomado parte de su laborioso día para ayudarme con este trabajo. A Elalita, por todo su amor y preocupación.

A Brenda, por brindarme su paciencia y cariño ante momentos de ansiedad, tristeza y felicidad. Gracias por tantas tardes de aventuras y malos chistes. A Luis, mi tío, por haber influenciado de manera positiva en mi desarrollo personal.

A mi familia entera, por recrear el verdadero significado de lealtad y protección.

Al Ingeniero Edwin Vera, un agradecimiento especial, por darme su total apoyo y paciencia en el desarrollo y culminación de este proyecto.

A mis amigos, Eri, Chicho, Vivi y Kléber, por levantarnos entre nosotros ante momentos que creíamos difíciles, y darle cabida a una sonrisa y un abrazo.

DEDICATORIA

*A un ser humano extraordinario,
Santiago.*

*A mis padres,
V́ctor y Doris*

*A Luis,
Este trabajo tambi3n es tuyo.*

ÍNDICE DE CONTENIDOS

		PÁGINA
	RESUMEN	ix
	INTRODUCCIÓN	xi
1	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
	1.1 Propiedades antioxidantes del cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	1
	1.1.1 Polifenoles: definición y clasificación	3
	1.1.1.1 Propiedades de los polifenoles	5
	1.1.1.2 Método de cuantificación de polifenoles	6
	1.1.2 Principios activos del cacao	7
	1.1.3 Aplicaciones del cacao	9
	1.2 Extracción de compuestos activos y aplicaciones	11
	1.2.1 Procedimientos de extracción	11
	1.2.1.1 Destilación por arrastre de vapor	11
	1.2.1.2 Maceración	12
	1.2.1.3 Extracción con fluidos supercríticos	14
	1.2.1.4 Extracción continua	15
	1.2.2 Factores que influyen en el proceso de extracción	17
	1.2.2.1 Tipo de solvente	17
	1.2.2.2 Tiempo de extracción	18
	1.2.2.3 Relación sólido- líquido	19
	1.2.2.4 Tamaño de partícula	19
	1.2.2.5 Temperatura	19
	1.2.2.6 pH	20
	1.2.3 Inhibición de la polifenol oxidasa	20
	1.2.3.1 Enzima polifenol oxidasa	22
	1.2.3.2 Agentes anti pardeamiento	22
2	METODOLOGÍA	24
	2.1 Evaluación de las propiedades fisico- químicas de la placenta de cacao	25
	2.1.1 Determinación de pH	25
	2.1.2 Determinación de sólidos solubles (°Brix)	25
	2.1.3 Determinación de acidez	26
	2.1.4 Determinación de porcentaje de humedad (% H)	26
	2.1.5 Determinación de contenido de polifenoles	27
	2.1.5.1 Equipos y reactivos	27
	2.1.5.2 Protocolo de Folin- Ciocalteu	28
	2.2 Determinación de las condiciones óptimas para la obtención del extracto de polifenoles a partir de la placenta de cacao	30
	2.2.1 Materia prima	30
	2.2.2 Diseño experimental	30

2.2.2.1 Variables del diseño	31
2.2.3 Proceso para la extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao	32
2.2.4 Determinación de la concentración de polifenoles de los extractos fenólicos de placenta de cacao	33
2.3 Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto fenólico de placenta de cacao en el extracto enzimático de polifenoloxidasa	35
2.3.1 Obtención del extracto enzimático de manzana	36
2.3.2 Determinación de la actividad inhibitoria del extracto fenólico	36
2.4 Diseño del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao a partir de desechos de procesamiento	38
2.5 Evaluación de los costos directos del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao	39
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
3.1 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de la placenta de cacao	41
3.1.1 Resultados de la determinación de pH	41
3.1.2 Resultados de la determinación de sólidos solubles (°Brix)	43
3.1.3 Resultados de la determinación de acidez	44
3.1.4 Resultados de la determinación del porcentaje de humedad	45
3.1.5 Resultados de la determinación del contenido de polifenoles en la placenta de cacao	45
3.2 Determinación de las condiciones óptimas para la obtención del extracto de polifenoles a partir de la placenta de cacao	47
3.2.1 Curva de calibración para análisis de polifenoles	47
3.2.2 Análisis de la concentración de polifenoles	48
3.2.2.1 Influencia de la concentración de solvente	51
3.2.2.2 Influencia de la relación sólido- líquido	54
3.2.2.3 Rendimiento de extracción	57
3.3 Evaluación de la actividad inhibitoria del extracto fenólico de placenta de cacao en el extracto enzimático de polifenoloxidasa	60
3.4 Diseño del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao a partir de desechos de procesamiento	65
3.4.1 Diagrama de bloques (BFD)	66
3.4.2 Diagrama de flujo del proceso (PFD)	68
3.4.3 Dimensionamiento y selección de equipos	71
3.4.3.1 Molino de cuchillas	71
3.4.3.2 Tanque de maceración	71
3.4.3.3 Baño ultrasónico	73
3.4.3.4 Centrífuga	73
3.4.3.5 Filtro	73

3.5 Evaluación de los costos directos del proceso de extracción de compuestos fenólicos de placenta de cacao	74
4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
4.1 Conclusiones	79
4.2 Recomendaciones	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	92

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Principales grupos de compuestos fenólicos	4
Tabla 1.2	Aplicaciones del método de destilación	12
Tabla 1.3	Condiciones críticas de los fluidos supercríticos mayormente utilizados	14
Tabla 3.1	Resultados de pH obtenidos para la placenta de cacao	42
Tabla 3.2	Resultados de sólidos solubles (°Brix) obtenidos para la placenta de cacao	43
Tabla 3.3	Resultados de acidez titulable obtenidos para la placenta de cacao	44
Tabla 3.4	Resultados del porcentaje de humedad obtenidos para la placenta de cacao	45
Tabla 3.5	Resultados del contenido de compuestos fenólicos en la placenta de cacao	46
Tabla 3.6	Contenido de polifenoles totales en muestras de extracto de placenta de cacao (equivalentes de ácido gálico por litro de extracto)	49
Tabla 3.7	Valores de la constante dieléctrica de los solventes y las mezclas de solventes utilizados en la investigación	52
Tabla 3.8	Rendimientos de extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao	58
Tabla 3.9	Unidades de actividad (UA) de la polifenol oxidasa de los extractos evaluados	63
Tabla 3.10	Lista de los equipos del diagrama PFD del proceso	69
Tabla 3.11	Identificación de corrientes del diagrama PFD del proceso	70
Tabla 3.12	Costos de producción por compra de materia prima y servicios industriales	75
Tabla 3.13	Costo aproximado de equipos principales para el proceso	75
Tabla 3.14	Costo aproximado de implementación de equipos, sistema eléctrico y de tuberías	77
Tabla AV.1	Hoja de especificación del molino para el proceso de obtención	101

de extracto fenólico a partir de placenta de cacao

Tabla AV.2	Hoja de especificación del tanque de maceración para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao	102
Tabla AV.3	Hoja de especificación del baño ultrasónico para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao	103
Tabla AV.4	Hoja de especificación de la centrífuga para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao	104
Tabla AV.5	Hoja de especificación del filtro para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao	105

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1	Complejos de color azul con el reactivo Folin- Ciocalteu	7
Figura 1.2	Diagrama del equipo de extracción por maceración, 1: entrada de la materia prima, 2: descarga de la materia prima macerada, 3: eje, 4: agitadores	13
Figura 1.3	Diagrama esquemático de un proceso de extracción con fluidos supercríticos	15
Figura 1.4	Esquema de un percolador	16
Figura 1.5	Ilustración del equipo para extracción Soxhlet	17
Figura 2.1	Esquema de la metodología experimental del proyecto	33
Figura 3.1	Curva de calibración construida a partir de estándares de ácido gálico a concentraciones de 0 a 100 ppm ($\lambda = 760$ nm)	48
Figura 3.2	Concentración de polifenoles totales extraídos de la placenta de cacao, de las muestras preparadas según el diseño experimental, en relaciones sólido- líquido de 1:2, 1:4, y 1:8, con solventes acuosos: etanol 0 %, etanol 50 % y etanol 75 %	50
Figura 3.3	Diagrama de medias para la concentración de solvente con intervalo LSD, con el 95 % de confianza	55
Figura 3.4	Diagrama de medias para la relación sólido- líquido con intervalo LSD, con el 95 % de confianza	56
Figura 3.5	Porcentaje de rendimiento de extracción de las muestras preparadas según el diseño experimental, en relaciones sólido- líquido de 1:2, 1:4, y 1:8, con solventes acuosos etanol 0 %, etanol 50 % y etanol 75 %	59
Figura 3.6	Cinética de reacción de los extractos enzimáticos de manzana (Sin EF) frente a la cinética de reacción de este extracto añadido el extracto fenólico (EF) de concentraciones 7,03 mg EAG/L y 15,36 mg EAG/L	61
Figura 3.7	Diagrama BFD correspondiente al proceso para obtener extracto fenólico a partir de placenta de cacao	67

Figura 3.8	Diagrama PFD del proceso seguido para la obtención de un extracto de polifenoles a partir de placenta de cacao	70
Figura AV.1	Costo de compra del molino de cuchillas	106
Figura AV.2	Costo de compra del tanque de maceración y baño ultrasónico	107
Figura AV.3	Costo de compra de la centrífuga	108
Figura AV.4	Costo de compra del filtro	109

ÍNDICE DE ANEXOS

PÁGINA

ANEXO I	
PROCESO DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO RICO EN POLIFENOLES A PARTIR DE PLACENTA EXTRAÍDA DE LA MAZORCA DEL CACAO	93
ANEXO II	
EJEMPLO DE CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL EXTRACTO DE PLACENTA DE CACAO	94
ANEXO III	
EJEMPLO DE CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA CON EL EXTRACTO FENÓLICO DE PLACENTA DE CACAO	95
ANEXO IV	
EJEMPLO DE CÁLCULO DE LAS CORRIENTES DEL DIAGRAMA PFD PLANTEADO PARA EL PROCESO	97
ANEXO V	
HOJAS DE ESPECIFICACIÓN DE LOS EQUIPOS PRINCIPALES SELECCIONADOS	100
ANEXO VI	
GRÁFICAS DEL CRITERIO DE ESTIMACIÓN DE COSTOS DE COMPRA DE LOS EQUIPOS PRINCIPALES DEL PROCESO	106

RESUMEN

El presente proyecto tuvo como objetivo evaluar el proceso de extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao, un desecho del procesamiento de la mazorca de cacao, para su aplicación como potencial agente inhibidor del pardeamiento enzimático.

Primero, la placenta de cacao se extrajo de la mazorca y se caracterizó mediante parámetros de acidez, pH, °Brix, porcentaje de humedad y concentración de polifenoles. Inmediatamente, la placenta fue molida y tamizada antes de iniciar la maceración. Se aplicó el método de extracción por maceración cinética y, se determinaron las condiciones óptimas de extracción mediante el empleo de solventes acuosos: etanol 0 %, etanol 50 % y etanol 75 %, en relaciones sólido-líquido 1:2, 1:4, y 1:8, en ensayos de 24 horas. El extracto fenólico obtenido fue sometido a un baño ultrasónico, centrifugación y filtrado.

Con base en los resultados de las pruebas experimentales, se encontró que se consigue una mayor extracción de los polifenoles de la placenta de cacao cuando se usa etanol 50 % en una relación 1:2, con un valor de 35,15 mg EAG/L. Se evaluó, adicionalmente, el rendimiento de extracción para cada extracto, de donde se obtuvo que, se obtiene mayor rendimiento cuando las condiciones son: etanol 50 % y relaciones sólido- líquido 1:4 y 1:8, con un valor de concentración de compuestos fenólicos equivalente a 15,36 mg EAG/L y 7,03 mg EAG/L, respectivamente.

Por consiguiente, se optó por evaluar los dos extractos que usan etanol 50 %, en relaciones 1:4 y 1:8, como posibles inhibidores de la acción de la polifenol oxidasa. La evaluación de los extractos fenólicos se realizó sobre un extracto enzimático de manzana, y se logró porcentajes de inhibición de la polifenol oxidasa igual a 83,03 % con el extracto de concentración 7,03 mg EAG/L, y 97,93 %, con 15,36 mg EAG/L de concentración de polifenoles.

Se eligió el extracto a 15,36 mg EAG/L, ya que consiguió el mayor porcentaje de inhibición de la polifenol oxidasa. A partir de las condiciones de obtención de este extracto, etanol 50 % y relación sólido- líquido 1:4, se diseñó la planta de procesamiento para la obtención de extracto fenólico.

Se consideró para el diseño, el volumen de desechos en el procesamiento de la mazorca de cacao del sector El Progreso, parroquia perteneciente a la provincia de El Oro, ya que se produce, en esta región, el 55 % de la totalidad de la producción cacaotera (Llivipuma Arias, 2013), lo que hace que el cacao sea el fruto más importante para este sector. El valor de producción corresponde a 4 000 quintales anuales de cacao y 160 quintales anuales de placenta de cacao, que equivale al 4 % de desechos del procesamiento de la mazorca (p. 26).

El proceso incluye un molino de cuchillas, un tamiz, un tanque agitado para maceración, tanque para baño ultrasónico, una centrífuga y un filtro a vacío. Este proceso permite obtener 197,40 kg de extracto fenólico al día a partir de 66,67 kg de placenta de cacao por día.

Finalmente, se evaluaron los costos directos del proceso: costo de materia prima, servicios industriales, equipos y el costo de implementación de los mismos; con lo que se determinó el precio por kilogramo de extracto fenólico de 1,40 USD. Adicionalmente, se obtuvo que el costo de extracto fenólico equivale al 37 % del costo de una pulpa de fruta. Esto lleva a concluir, que no es rentable frente al valor que se paga por la pulpa.

INTRODUCCIÓN

Dentro de la industria alimenticia, en el manejo de frutas y vegetales, uno de los efectos no deseados es la presencia de coloraciones café oscuro en la superficie debido al daño en la integridad del fruto, que disminuyen la aceptación del consumidor y la calificación de calidad del fruto. Este efecto se ha tratado de evitar a través de la aplicación de tecnologías físicas y químicas sobre el alimento; sin embargo, la mayoría de estas técnicas afectan las características organolépticas del producto. Este fenómeno es conocido como pardeamiento enzimático. Se da por reacciones químicas catalizadas por la polifenol oxidasa. (Othman, Ismail, Abdul Ghani y Adenan, 2007, p. 1 523).

Se han llevado a cabo investigaciones con la finalidad de hallar sustancias antioxidantes, que no solo prolonguen el tiempo de vida de productos alimenticios, sino también participe en la eliminación de radicales en organismos vivos (Da Silva, Darmon, Fernandez y Mitjavila, 1991, p. 1 549).

Se conoce que los alimentos de origen vegetal poseen compuestos antioxidantes, en especial las frutas. Estos compuestos son capaces de evitar la reacción de generación de radicales libres, que provocan el envejecimiento y la oxidación. El cacao y sus productos derivados son fuentes ricas en estos compuestos (Kim y Keeney, 1984, p. 3 695).

El cacao es un fruto que se encuentra en la región Amazónica y países de clima tropical. Su consumo es a nivel mundial como chocolate y licor de cacao, y se ha visto influenciado por la variedad de confiterías que han aparecido en los últimos años. No sólo se encuentra en el área alimenticia, sino también en el área cosmética, de aseo y farmacéutica (Hii, Law, Cloke y Suzannah, 2008, p. 153).

En estudios científicos, al cacao se le ha relacionado con varios efectos que favorecen la salud del ser humano, en especial, cuando se refiere a enfermedades degenerativas. Se atribuye estos beneficios a compuestos activos presentes en el cacao, los polifenoles. Estos tienen características anti

carcinógenas, anti trombóticas, vasodilatadoras, anti microbianas y analgésicas (Hii et al., 2008, p. 153).

Alrededor del 60 % del total de compuestos fenólicos en las almendras de cacao son monómeros flavanoles, que se conocen como potenciales candidatos para combatir radicales libres que afectan al organismo del ser humano. Por otra parte, los polifenoles y flavonoides, han sido estudiados debido a que han demostrado ser capaces de tener efectos contra bacterias y hongos (Jalal y Collin, 1977, p. 1 377).

La mayoría de artículos de investigación sobre las propiedades de los polifenoles del cacao, han destacado la acción de los flavonoides. La capacidad antioxidante de estos compuestos activos, le dan al cacao la posibilidad de ser aplicado como potencial inhibidor de ciertas reacciones de oxidación. Una de ellas es la que se lleva a cabo durante el pardeamiento enzimático (Jalil e Ismail, 2008, p. 2 191).

El cacao es considerado un factor muy influyente en la economía del Ecuador, con 2 700 millones de dólares acumulados durante el período 2002- 2011, según el Banco Central del Ecuador, en el boletín emitido en el año 2012 (BCE, 2012, p. 1).

Se plantea en esta investigación, una alternativa al uso de desechos del procesamiento de la mazorca de cacao. La placenta de cacao se encuentra al interior de la mazorca, y mantiene unidas a las almendras. Esta parte se desecha para utilizar las almendras del cacao, únicamente. Se evalúa el contenido fenólico de la placenta y se prueba como posible inhibidor de la acción de la polifenol oxidasa.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL CACAO (*THEOBROMA CACAO*)

Los antioxidantes son compuestos presentes en los alimentos que, en bajas concentraciones, en comparación con un sustrato oxidable, retrasa o previene, de manera significativa, la oxidación del sustrato en el alimento. El término “sustrato oxidable” envuelve a la mayoría de sustancias presentes en alimentos, excepto el agua, además, encontradas en tejidos vivos, proteínas, lípidos, carbohidratos y el ADN. A pesar de, que la definición anterior no recalca todas las acciones que llevaría a cabo un antioxidante, sí señala la importancia de tomar en cuenta el lugar de donde proviene esta sustancia y el objetivo de su estudio (Packer y Cadenas, 2001, p. 4).

Se tienen dos categorías de antioxidantes, naturales y sintéticos. Los sintéticos tienen estructuras fenólicas con sustituciones alquilo, por ejemplo, el butilato hidroxitolueno (BHT). Por otro lado, los antioxidantes naturales incluyen compuestos fenólicos como flavonoides y ácidos fenólicos, compuestos nitrogenados, carotenoides y ácido ascórbico (Othman et al., 2007, p. 1 523; Velioglu, Mazza, Gao y Oomah, 1998, p. 4 113).

Entre las características de los antioxidantes, está la capacidad de retrasar o inhibir la oxidación al evitar la propagación de reacciones de oxidación en cadena y la eliminación de radicales libres; es decir, es capaz de neutralizar un sistema biológico de radicales libres como el oxígeno y el nitrógeno, y de radicales lipídicos, protegiéndolo de la acción de estos radicales. Esto hace que frutas y vegetales, que contienen estos compuestos, resulten beneficios para la salud. Incluso, el contenido de antioxidantes podría definir la calidad de frutas y verduras. Es importante indicar que los compuestos antioxidantes no se limitan a frutas y verduras, sino también se

encuentran en granos enteros, con una mayor actividad antioxidante en estos últimos (Granatum, 2011, p. 35; Gil y Serra, 2010, p. 167).

Los beneficios de los antioxidantes se les atribuyen a su acción fisiológica que genera efectos antialérgicos, antiinflamatorios y cardioprotectores. Por ejemplo, cuando el plasma sanguíneo se expone, *in vitro*, al humo de cigarrillo, ocurre la degradación lipídica y el ascorbato actúa inhibiendo este proceso (Viñas, Usall, Echeverría, Graell, Lara y Recasens, 2013, p. 107; Packer y Cadenas, 2001, p. 4).

El interés de ampliar el conocimiento sobre los antioxidantes naturales se ha intensificado desde las restricciones de la aplicación de antioxidantes como el BHT, potencial cancerígeno, y la búsqueda de sustancias de origen natural que puedan ser aprovechadas en su máximo potencial. Una muestra de esta investigación es el estudio de los compuestos antioxidantes dentro de la semilla de la uva y su comparación con el antioxidante BHA (Jayaprakasha, Selvi y Sakariah, 2003, p. 117).

Igualmente, se busca aplicarlos en la prevención de malos sabores, rancidez y fenómenos similares relacionados con la degradación oxidativa de los lípidos o peroxidación regida por la acción de la enzima lipoxigenasa en cada planta. Varios científicos relacionan a los antioxidantes con inhibidores de esta acción y el deterioro del alimento (Packer y Cadenas, 2001, p. 3).

Se ha encontrado que compuestos activos presentes en frutas, vegetales, especias y plantas medicinales tradicionales juegan un papel importante frente a enfermedades al ser humano, como cáncer y enfermedades cardiovasculares. La manera en que actúan estos compuestos sobre las enfermedades es a través del cese de la producción de los radicales libres que producen estrés oxidativo (Tsao y Deng, 2004, p. 85).

Cientos de compuestos activos han sido categorizados como antioxidantes. Los antioxidantes pueden ser hidrosolubles, liposolubles y la mitad son insolubles. Dentro

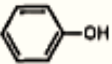

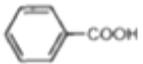
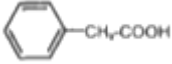
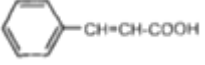
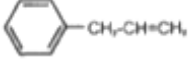
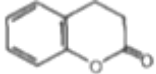
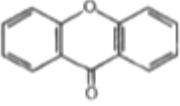
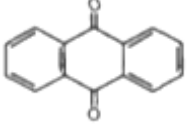
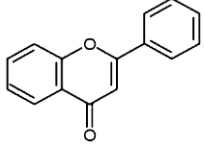
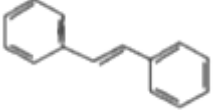
del grupo de los antioxidantes encontrados en frutas, vegetales y semillas, se encuentran los compuestos fenólicos que son solubles y conforman el grupo más importante, junto a los carotenoides. Parte de los insolubles son los ésteres de ácido cinámico. Se tienen otros antioxidantes como carnosina, ácido fítico, taurina, timol, los derivados del ácido gálico, poliaminas, estrógenos, creatinina y ácidos rosmarínicos. A continuación, se amplía información acerca de los polifenoles (Tsao y Deng, 2004, p. 85; Gil y Serra, 2010, p. 167; Packer y Cadenas, 2001, p. 4).

1.1.1 POLIFENOLES: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN

Los compuestos fenólicos son compuestos antioxidantes. Estos constituyen uno de los grupos de componentes activos más extensos dentro del reino vegetal. Existen más de 8000 estructuras fenólicas conocidas hasta la actualidad. Las plantas generan productos secundarios que contienen un grupo fenol. Algunos de estos compuestos son solubles en solventes orgánicos, otros en agua únicamente, como los ácidos carboxílicos y glicósidos, y otros, que son grandes polímeros insolubles (Bravo, 1998, p. 317; Zeiger, 2006, p. 542).

En la Tabla 1.1, se señala los principales grupos de compuestos fenólicos conocidos. A estos compuestos se los encuentra en la mayoría de frutas, vegetales, nueces, semillas, flores, bebidas, y alimentos elaborados, como ingrediente natural; además, los compuestos fenólicos contribuyen al sabor característico y el color de las frutas. Los pigmentos en las plantas se les atribuye a dos grupos principales de polifenoles: carotenoides y flavonoides. Los carotenoides dan el color amarillo, naranja y rojo, mientras que, los flavonoides, varían en un rango de color (Wollgast y Anklam, 2000, p. 424; Zeiger, 2006, p. 551).

Tabla 1.1 Principales grupos de compuestos fenólicos

Tipo	Nomenclatura	Estructura principal
Fenoles	C_6	
Benzoquinonas	C_6^n	
Ácidos fenólicos	C_6-C_1	
Ácidos fenilacéticos	C_6-C_2	
Ácidos cinámicos	C_6-C_3	
Fenilpropenos	C_6-C_3	
Cumarinas	C_6-C_3	
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$	
Antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$	
Flavonoides	$C_6-C_3-C_6$	
Lignan Neolignan	$(C_6-C_3)_2$	

(Bravo, 1998, p. 318)

Un polifenol puede ser definido como antioxidante al cumplir dos condiciones básicas. La primera, en concentraciones bajas, comparado con el sustrato a oxidarse, el polifenol debe estar en la capacidad de provocar el retraso del proceso de oxidación de radicales libres o autooxidación, o evitarlo. La segunda, el radical formado después de suceder la captación de radicales libres, debe ser estable para evitar reacciones de oxidación en cadena (Packer y Cadenas, 2001, p. 309).

Entre los compuestos fenólicos se encuentran a los fenoles, ácidos fenólicos, y ácidos fenilacéticos; ácidos cinámicos, por ejemplo, el ácido ferúlico y el cafeico; cumarinas e isocumarinas, flavonoides (flavonoles) y taninos. La clasificación de este tipo de antioxidantes se puede ordenar en diez tipos diferentes dependiendo de su estructura química. El grupo de los flavonoides, sin embargo, se puede subdividir en 13 clases más (Gil y Serra, 2010, p. 167).

En el grupo de los flavonoides, están los flavanoles. Estos pueden existir en forma monomérica con el nombre de catequinas, o polimérica, como proantocianidinas. Las catequinas se encuentran comúnmente en frutos, como catequina y equicatequina. Por otro lado, las proantocianidinas o taninos, forman complejos con las proteínas de la saliva y causan astringencia de muchos frutos. A lo largo de la maduración de muchas frutas, la astringencia suele desaparecer (Viñas et al., 2013, p. 98).

1.1.1.1 Propiedades de los polifenoles

Los polifenoles han tomado gran importancia debido a la variedad de aplicaciones que presenta. Gracias a la búsqueda de sustancias de origen natural para la sustitución de antioxidantes sintéticos, los polifenoles han justificado las amplias investigaciones llevadas a cabo en los últimos años. Es así que, los compuestos fenólicos no sólo lograron demostrar su potencial como antioxidante, sino una diversidad de aplicaciones útiles. Algunas aplicaciones a escala industrial se

encuentran en el procesamiento de pinturas, papel, y cosméticos; además, como agentes de curtiembre; y, en la industria de alimentos, en forma de colorantes naturales y preservantes (Bravo, 1998, p. 317).

Los polifenoles, entre la variedad de propiedades que posee, se tienen las siguientes: anti- carcinógeno, antiinflamatorio, elevador del sistema inmune, antimicrobiano y analgésico. Adicionalmente, los polifenoles ejercen estas propiedades como antioxidantes, inhibidores de la actividad de enzimas como la C quinasa, y tirosina quinasa (Porter, 2006, p. 49; Wollgast y Anklam, 2000, p. 424).

Da Silva et al. (1991), comprobaron que un específico tipo de polifenoles, procianidinas, demostraban una capacidad para captar radicales libres de oxígeno. Esta habilidad para captar los radicales libres es uno de los aspectos más importantes dentro del efecto antioxidativo, ya que se asocia con beneficios a la salud (p. 1 551).

Los isoflavonoides están en el grupo de los flavonoides. Estos tienen características insecticidas y antiestrogénicos. Un ejemplo se tiene al evaluar cierta cantidad de animales que consumen vegetales con este tipo de compuestos fenólicos en su estructura, tienden a la infertilidad. Sin embargo, también son responsables de poderes anticancerígenos y antimicrobianos contra infecciones de hongos y bacterias (Zeiger, 2006, p. 554).

1.1.1.2 Método de cuantificación de polifenoles

La determinación de la cantidad de polifenoles solubles totales se realiza en base al procedimiento descrito inicialmente por Singleton y Rossi, detallado en Georgé et al. (2005). El método es espectrofotométrico y utiliza el reactivo de Folin- Ciocalteu que sirve para determinar la facilidad que tienen los fenoles para reaccionar con un

agente oxidante. Se produce una reacción redox, por lo que se considera un método de determinación de la actividad antioxidante total. Es un método simple, pero sensible a los volúmenes de muestra tomados, concentración de los reactivos, tiempo y temperatura de incubación (p. 1 370; Blainski, Lopes y De Mello, 2013, p. 6 853).

Este reactivo contiene sales de molibdeno y tungsteno que reaccionan con cualquier tipo de fenol oxidándolo. Interactúan los componentes fenólicos con la sustancia oxidante, el reactivo Folin- Ciocalteu y el carbonato de sodio, en un medio básico. Se genera complejos de color azul intenso proporcionales al número de grupos hidroxilo de la molécula, o a la concentración de polifenoles, como se observa en la Figura 1.2. De derecha a izquierda, la concentración de polifenoles disminuye (Blainski et al., 2013, p. 6 853).

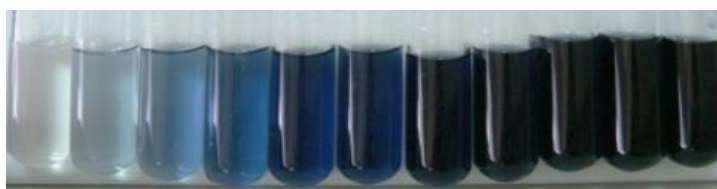


Figura 1.1 Complejos de color azul con el reactivo Folin- Ciocalteu
(Theppakorn y Ploysri, 2014, p. 504)

Se logra cuantificar los compuestos fenólicos presentes a través del reporte de absorbancia a 760 nm, en un espectrofotómetro, tomando como base la recta de calibración construida con estándares de ácido gálico.

1.1.2 PRINCIPIOS ACTIVOS DEL CACAO

Antes de describir los principios activos del cacao, es importante conocer que, el cacao provee efectos nutricionales para el organismo humano. Los granos de cacao, por ejemplo, tienen 54 % de grasa natural, en comparación con cacao en polvo

ligeramente desengrasado que apenas tiene 24,5 % de manteca de cacao, 19,8 % de proteínas, 10,8 % de hidratos de carbono, 5,6 % de agua y 37,7 % de fibra (Siedentopp, 2009, p. 197).

Entre los principios activos del cacao, se encuentran la teobromina con un contenido de 2,3 % y la cafeína con un 0,05 a 1,3 %; además, se conoce la presencia de la anandamida, un compuesto que genera adicción, pero de rápida degradación en el organismo, lo que significa que no produce efectos notables en él, además, la concentración de esta sustancia en el cacao es inferior a la de cualquier sustancia adictiva (Siedentopp, 2009, p. 197).

Como minerales y vitaminas el cacao contiene potasio, magnesio, fósforo, calcio, hierro, y tiamina, riboflavina y niacina. Se han estudiado las partes del cacao y se encontró una fuente rica en compuestos fenólicos. Los polifenoles presentes en el cacao contienen mayor actividad antioxidante que los encontrados en tés y vinos tintos, ajo y fresa, lo que hace prestar atención a los componentes del cacao para diversas aplicaciones (Keen, Holt, Oteiza, Fraga y Schmitz, 2005, p. 299).

Los flavonoides predominan en el grupo de compuestos fenólicos que posee el cacao. Estos actúan como antioxidantes y, se les ha atribuido beneficios en el tratamiento de enfermedades y, tener efectos contra bacterias y hongos (Jalal y Collin, 1977). La estructura de los flavonoides representa una base para el desarrollo de las propiedades como captor de radicales libres y propiedades antioxidantes quelantes (p. 1 378; Keen et al., 2005, p. 299).

Se destaca, entre el grupo de los flavonoides, al flavonol epicatequina, pues tiene efectos protectores frente al desarrollo de infartos, cáncer y diabetes. (Siedentopp, 2009, p. 197).

1.1.3 APLICACIONES DEL CACAO

El cacao se ha distinguido de otros frutos por las propiedades que se pueden aprovechar de él. Es así que, se han desarrollado maneras en las que el ser humano puede beneficiarse del consumo del cacao, por ejemplo: chocolate, licor de cacao y cacao en polvo; incluso, se puede encontrar en productos cosméticos, farmacéuticos y artículos de aseo (Hii et al., 2008, p. 153; Vinson, Proch y Zubik, 1999, p. 4 821).

Se tiene información acerca de compuestos activos, en especial los flavonoides, en el cacao, que son capaces de trabajar de manera aislada, en contra de enfermedades riesgosas para el ser humano. A partir de estos estudios, se han generado hipótesis que el consumo de productos alimenticios ricos en flavonoides, como el chocolate y el cacao en polvo, está relacionado con la disminución del riesgo de sufrir alguna enfermedad de tipo vascular. Los flavonoides del cacao, además, resultan más efectivos comparados con el ascorbato y la α - tocoferol, en la oxidación de las células endoteliales del LDL, pues provocan un aumento en el poder antioxidante total del plasma sanguíneo y, esto ayuda a protegerse contra la producción excesiva de peroxinitrito, que causa inflamación (Keen et al., 2005, p. 301; Rein, Paglieroni, Pearson, Wun, Schmitz, Gosselin y Keen, 2000, p. 2 120S).

Lo que provoca ese comportamiento sobre las enfermedades cardiovasculares es la activación y funcionamiento de plaquetas. Las plaquetas en la sangre participan en estas enfermedades, de manera crucial. Se habla de la aspirina y antioxidantes como ejemplos de inhibidores de plaquetas, pero también los compuestos fenólicos (Rein et al., 2000, p. 2 120S).

Por otro lado, al flavonol catequina se le atribuye beneficios a la piel. Esto hace que, el consumo frecuente de cacao, retrase el envejecimiento y aumente la hidratación de la piel (Siedentopp, 2009, p. 197).

Algunos compuestos activos, como los fenoles, tienen propiedades desinfectantes, por lo que se emplean en limpieza de heridas y fabricación de antisépticos. Además, los fenoles son aplicados en la fabricación industrial de aspirina y propofol, un potente anestésico (Claramunt, Cornago, Esteban, Farrán, Pérez y Sanz, 2015, p. 103).

Extractos del cacao han sido mayormente aplicados a la búsqueda de combatir las enfermedades más comunes. Un ejemplo muy llamativo es la aplicación de los polifenoles como agentes anti- *Helicobacter pylori*, que produce gastritis y úlceras. Estos extractos muestran una actividad inhibitoria considerable. Otro ejemplo es el uso de la teobromina del cacao como supresor de la tos (Chávez, Aranda, García y Pastene, 2011, p. 265; Porter, 2006, p. 49).

El cacao fue determinado como una fuente rica en flavonoides, productos del chocolate contienen cantidades proporcionales del cacao, y estas pueden tener un alto contenido de polifenoles por porción, en comparación con otros alimentos ricos en esos compuestos activos. Esto lleva a la idea de aplicaciones a partir del chocolate, ya que es un producto de consumo directo y de fácil disponibilidad (Porter, 2006, p. 49).

Además, es una fuente rica en micro y macronutrientes, por ejemplo, el cobre encontrado en el cacao contribuye significativamente a la dieta del ser humano. Se sugiere que si los efectos beneficiosos se deben a los flavonoides del cacao más que a los demás compuestos activos, se debe tomar control por los productos del cacao que no los contienen (Jalil e Ismail, 2008, p. 2 191).

1.2 EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS Y APLICACIONES

La extracción es un paso muy importante dentro del aislamiento, identificación y uso de compuestos fenólicos, donde, se debe tomar en cuenta que, no hay un único método de extracción. Como muestra se tiene que, los compuestos fenólicos presentes en plantas difieren en su estructura, y es complicado establecer un método estándar de extracción que aplique, de forma simultánea, a todos los polifenoles (Bucić-Kojić, Planinić, Tomas, Bilić y Velić, 2007, p. 236).

1.2.1 PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN

Los métodos de extracción de compuestos activos son muy diversos debido a la gran cantidad, variedad y complejidad de los compuestos activos dentro de la planta. El optar por un tratamiento o no, dependerá de la eficiencia de extracción que entregue ese procedimiento. A continuación, se describen los principales métodos de extracción utilizados.

1.2.1.1 Destilación por arrastre de vapor

El procedimiento de destilación es empleado para separar los compuestos presentes en una mezcla líquida. Se aplica vapor de agua, que se genera por ebullición, sobre la materia prima. El vapor entra en contacto con el líquido o la materia prima, y es capaz de disolver y extraer compuestos activos; al condensar, se recogen estas sustancias (Romero, 2004, p. 62).

Este fenómeno, en una columna, aparece como un contacto en contracorriente líquido- vapor; es decir, para cada etapa, las fases: líquida y vapor tratan de llegar a un equilibrio de temperatura, presión y composición. Los compuestos más ligeros

tienden a concentrarse en la fase vapor, y los más pesados en la fase líquida. La fase vapor llega a enriquecerse de los componentes de menor temperatura de ebullición; de la misma manera, las sustancias de mayor temperatura de ebullición descienden junto a la fase líquida. En la Tabla 1.2, se presenta las aplicaciones de este método de separación (Perry y Green, 2001, p. 13- 4).

Tabla 1.2 Aplicaciones del método de destilación

Área de aplicación	Uso
Alimenticia	<ul style="list-style-type: none"> • Separación de la cafeína del café y té • Extracción de aceites esenciales
Farmacéutica	<ul style="list-style-type: none"> • Purificación de productos vitamínicos
Metalúrgica	<ul style="list-style-type: none"> • Producción de cobre • Recuperación de elementos de tierras raras
Procesamiento de polímeros	<ul style="list-style-type: none"> • Separación de catalizadores de reacciones de procesos
Química	<ul style="list-style-type: none"> • Separación de olefinas y parafinas

(Perry y Green, 2001, p. 13- 4)

1.2.1.2 Maceración

La metodología por maceración se caracteriza por realizarse dentro de un recipiente a una temperatura específica y constante, durante un tiempo determinado, donde se pone en contacto la materia prima vegetal con el solvente (Álvarez y Bagué, 2012, p. 121).

Dentro de este procedimiento, se puede tener variación de ciertos parámetros, que crean tipos de maceración. Por ejemplo, la maceración con agitación mecánica constante, es conocida como maceración cinética. En el caso de una variación de la temperatura, entre 40 y 50 °C, la operación se conoce como digestión. La elección dependerá de la materia prima que se tratará y las características de los compuestos

activos de esta. Un esquema del equipo para maceración se puede observar en la Figura 1.2 (Álvarez y Bagué, 2012, p. 121).

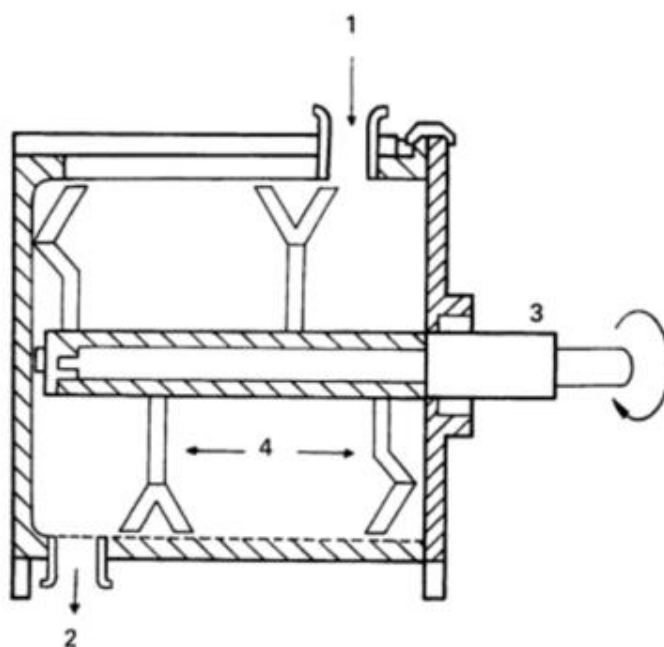


Figura 1.2 Diagrama del equipo de extracción por maceración, 1: entrada de la materia prima, 2: descarga de la materia prima macerada, 3: eje, 4: agitadores (Sharapin, 2000, p. 43)

Entre las ventajas de este proceso, está la posibilidad de emplear a pequeña escala, por la facilidad de manipulación y de control. La desventaja es el tiempo que toma el proceso y la dificultad de lograr la recuperación total de los compuestos activos. Muchas veces, se recomienda repetir la maceración para reducir las pérdidas del extracto, ya que disminuye el extracto retenido en el residuo y se recupera mayor cantidad de solvente. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación sólido-líquido aumenta (Sharapin, 2000, p. 42).

1.2.1.3 Extracción con fluidos supercríticos

Esta forma de extracción emplea gases como solventes. La ventaja es que permite obtener un producto más limpio, libre de sustancias químicas contaminantes. Los fluidos supercríticos tienen la capacidad de trabajar con materiales sólidos que contienen compuestos volátiles y poco volátiles, donde el factor del cual depende el porcentaje de extracción, es la densidad del gas. Se habla de una etapa donde las condiciones son de temperatura y presión crítica para el gas. En este punto, la densidad del gas alcanza un valor comparable a la del líquido, e incrementa el poder de extracción del solvente (Álvarez y Bagué, 2012, p. 123).

El gas más conocido es el dióxido de carbono, CO₂, utilizado en la industria alimenticia. La temperatura crítica de este gas es 31,1 °C que ayuda a prevenir la descomposición de sustancias termolábiles. En la Tabla 1.3, se muestra un resumen de los solventes mayormente utilizados.

Tabla 1.3 Condiciones críticas de los fluidos supercríticos mayormente utilizados

Fluido	Temperatura crítica, Tc (°C)	Presión crítica, Pc
CO ₂	31,1	72,8
Etano	32,3	48,2
Etileno	9,3	49,7
Amoníaco	132,5	111,3
Agua	374,2	217,6
Propano	96,6	41,9

(Álvarez y Bagué, 2012, p. 124)

Los fluidos más estudiados son el CO₂ y el agua, pues resultan los más económicos. Además, tienen ventajas de mínima toxicidad y no son inflamables. Entre las aplicaciones que presenta este método, se encuentran: extracción de cafeína, residuos de petróleo, devolatización de polímeros, formación de aerogel, entre otros.

A continuación, se observa un diagrama básico en la Figura 1.3 que describe el método de extracción con fluidos supercríticos (Perry y Green, 2001, p. 22- 22).

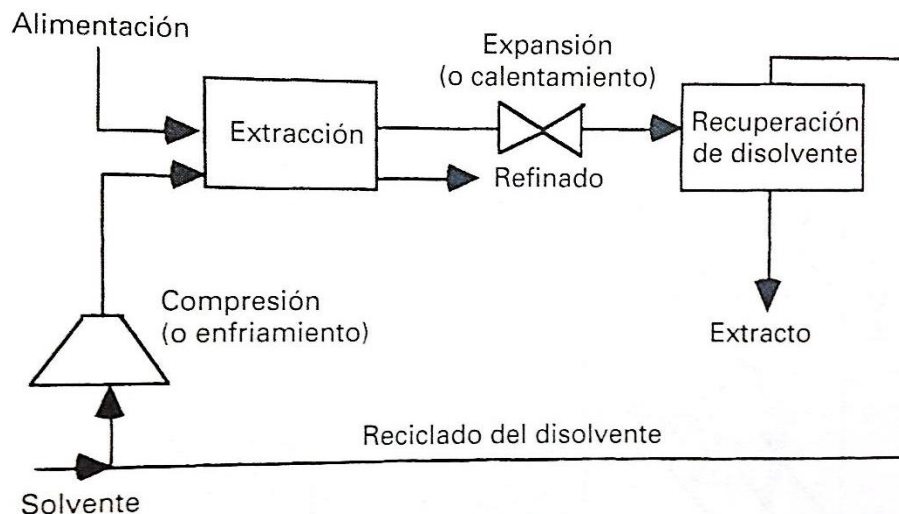


Figura 1.3 Diagrama esquemático de un proceso de extracción con fluidos supercríticos (Perry y Green, 2001, p. 22- 19)

Entre las aplicaciones de este método, se tiene la obtención de productos naturales como: cardamomo, vainilla, jengibre, salvia, entre otros. Además, se emplea para la separación de pesticidas, extracción de colesterol y el refinamiento de extractos de materiales frescos (Liu y Liptak, 1999, p. 38)

1.2.1.4 Extracción continua

Se realiza en un equipo que permita la evaporación, condensación y flujo continuo del solvente. Resulta un método muy eficiente, ya que el solvente aumenta su capacidad extractiva al reingresar. Es decir, el solvente al ingresar tiene mayor poder extractivo que el desalojado, pues este último ya se encuentra saturado al momento de removerlo. Este método es aplicado en la separación de compuestos poco

solubles, que con los métodos anteriores no se pudieron extraer (Villegas, Acereto y Vargas, 2006, p. 3- 18).

La extracción continua se puede explicar a través de dos métodos dentro de este grupo: percolación y extracción Soxhlet. El primero es conocido como percolación. Consiste en pasar el solvente a través del material vegetal, hasta su extracción completa. La percolación, en pequeña escala, se realiza en equipos llamados percoladores. En la Figura 1.4, se puede percatar un modelo de percolador (Sharapin, 2000, p. 45).

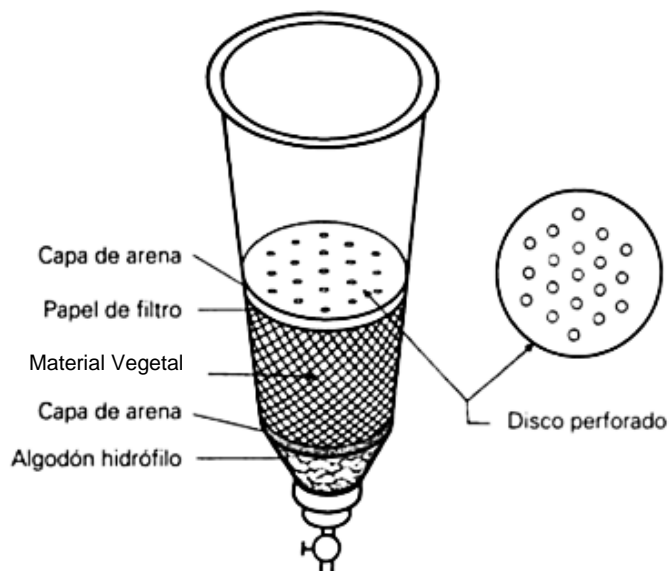


Figura 1.4 Esquema de un percolador
(Sharapin, 2000, p. 45)

El segundo método es la extracción con el equipo Soxhlet. Este equipo está compuesto por tres piezas de vidrio Pyrex: un matraz redondo en la parte inferior, donde el solvente se calienta, un refrigerante en la parte superior para condensar los vapores del solvente, y en el medio, un extractor, que es un cartucho de celulosa donde se coloca la muestra del material a extraer. En la Figura 1.5, se muestra un equipo para esta extracción (Villegas et al., 2006, p. 3- 19).

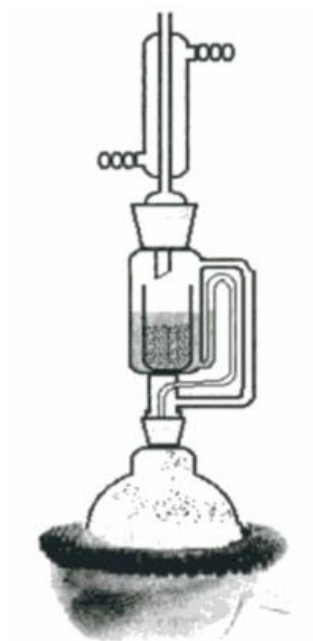


Figura 1.5 Ilustración del equipo para extracción Soxhlet
(Villegas et al., 2006, p. 3- 20)

1.2.2 FACTORES QUE INFLUYEN EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN

La selección del método correcto de extracción es muy importante, y se ve influenciado por otros factores, como el tipo de solvente a utilizar, el tiempo de extracción, la relación sólido- líquido, tamaño de partícula del material a tratar temperatura, y pH (Domínguez, 2013, p. 293).

1.2.2.1 Tipo de solvente

La selección del solvente es uno de los pasos más importantes dentro del proceso de extracción. Los solventes más utilizados en la extracción de polifenoles a partir de

material vegetal, son: metanol, etanol, propanol y mezclas de estos con agua, además, acetona, acetato de etilo y dimetilformamida (Bucić-Kojić et al., 2011, p. 85).

La solubilidad de los compuestos fenólicos se ve influenciada por este factor y la interacción de estos con otros compuestos activos presentes en el material a evaluar. Esto muestra que no hay un proceso único ni completamente satisfactorio para extraer la totalidad de los compuestos fenólicos o un solo tipo de polifenoles (Naczk y Shahidi, 2004, p. 96).

Pinelo, Rubilar, Jerez, Sineiro y Núñez (2005), afirman que las mezclas alcohol: agua tienen mejor desempeño en el proceso de extracción frente a solventes de un solo componente. Adicionalmente, observó que el etanol y el agua, desde el punto toxicológico, son más seguros y aptos para trabajar en la industria alimenticia que otros solventes orgánicos (p. 2 111).

1.2.2.2 Tiempo de extracción

Este factor es dependiente del tipo de solvente y el método de extracción que se vaya a utilizar. El tiempo debe ser suficiente para dejar que los compuestos activos requeridos se separen, sin embargo, no debe ser excesivo, pues influye en el costo de solvente, consumo de energía y mano de obra adicional (Sharapin, 2000, p. 40).

Naczk y Shahidi (2004), mencionan que largos tiempos de extracción provocan un aumento en las posibilidades de oxidación de los polifenoles, excepto si se coloca un agente reductor al solvente de la extracción (p. 97).

1.2.2.3 Relación sólido- líquido

El proceso de extracción también se ve influenciado por la relación entre el material con el solvente. Se encontró que relaciones entre 1:5 y 1:10 incrementan la capacidad de extracción de taninos cuando se utiliza acetona 70 %, como solvente (Naczki y Shahidi, 2004, p. 97).

1.2.2.4 Tamaño de partícula

Generalmente, un pequeño tamaño de partícula beneficia el contacto entre el compuesto activo y el solvente. Sin embargo, la presencia de partículas muy finas dificulta el proceso de extracción, ya que en muchas ocasiones, se compacta y forma un tipo de emulsión que obliga a filtrar el extracto en la etapa final. En cambio, si el tamaño de partícula es muy grande, la disolución de los compuestos en el solvente, es lenta y no se lograría obtener la mayoría de compuestos activos. Se recomienda, entonces, un valor medio de tamaño de partícula, moderadamente grueso (Sharapin, 2000, p. 39).

1.2.2.5 Temperatura

El proceso de extracción mejora cuando la temperatura aumenta. Este factor influye de manera positiva al rendimiento de extracción. Sin embargo, sobre la actividad antioxidante el efecto es negativo, pues decrece esta característica en los extractos con el incremento de temperatura cuando se utiliza etanol y hexano como solventes. Por otro lado, cuando se emplea agua como solvente, se ve una influencia positiva en la actividad antioxidante, lo que puede implicar una relación entre la actividad antioxidante y la vitamina E, fenoles simples y productos de la reacción de Maillard obtenidos durante una extracción a altas temperaturas. Los compuestos activos

encargados de esta actividad en extracciones con etanol y hexano son los carotenoides (Domínguez, 2013, p. 543).

Se debe tomar en cuenta que, con el aumento de temperatura, se pueden ver afectados compuestos activos termolábiles, de manera total o parcial. También, durante el proceso de extracción, se pierden sustancias volátiles (Sharapin, 2000, p. 39).

1.2.2.6 pH

Este factor influye en la solubilidad de los compuestos activos en el solvente. A un valor de pH determinado se pueden formar sales, pero el pH resulta independiente del material vegetal con el que se trabaje. El empleo de solventes orgánicos de baja polaridad necesita que, previo al procedimiento de extracción, se trate con soluciones alcalinas para liberar los compuestos de las sales y, de esta manera, hacerlos solubles en el solvente orgánico. Se sugiere un valor de pH ácido cuando, para la extracción de compuestos de interés, se utilizan soluciones acuosas. Esto se realiza con la finalidad de convertir los compuestos a extraer en sus respectivas sales y logren su solubilidad con el agua presente en el solvente de extracción (Sharapin, 2000, p. 40).

1.2.3 INHIBICIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA

La maduración de frutas se da tras reacciones como: la hidrólisis del almidón, la síntesis de antioxidantes (carotenoides y polifenoles) y compuestos volátiles. Esto influye sobre la capacidad antioxidante de los compuestos activos que posee la fruta (Mier y Cáez, 2011, p. 106).

El pardeamiento enzimático es un cambio indeseable en los alimentos, pues los hace menos agradables y de baja calidad. Se han desarrollado tecnologías para reducir e inhibir este fenómeno. Este proceso necesita la presencia de tres componentes, y si uno de ellos no estuviera, el pardeamiento en el alimento, no se daría (Bolaños, Lutz y Herrera, 2003, p. 40).

Estos componentes son:

- Polifenol oxidasa
 - Sustrato
 - Oxígeno
- } Pardeamiento Enzimático

Esta reacción provoca la formación de o- quinonas que polimerizan y forman pigmentos de color café. Las quinonas son compuestos muy reactivos que interactúan con otras moléculas y dan como resultado compuestos de color oscuro. Esta coloración se ve en productos alimenticios y genera rechazo por los consumidores, por esta razón, se ha estudiado la acción de la polifenol oxidasa en distintos frutos (Doğan, Turan, Doğan, Arslan y Alkan, 2005, p. 10 224).

Los daños mecánicos son función de factores ambientales y de manipulación. Cuando estos se producen por golpes, son más graves si la temperatura a la que sucede es elevada, ya que influye en la rapidez con la que las enzimas provocan el pardeamiento. La temperatura juega un papel determinante en la conservación de alimentos. Se recomienda mantener en frío, pues se inhiben las reacciones asociadas con el pardeamiento enzimático (Viñas et al., 2013, p. 191).

1.2.3.1 Enzima polifenol oxidasa

La polifenol oxidasa (PFO) es un enzima presente en los tejidos vegetales. Es conocida como tirosinasa, fenolasa, catecol oxidasa, catecolasa, monofenol oxidasa, o-diphenol oxidasa y ortofenolasa, su nombre depende del sustrato en el que actúe. Tiene un centro activo en su estructura donde se encuentran dos átomos de cobre unidos a histidina, y alrededor, aminoácidos que se unen a los sustratos (Doğan et al., 2005, p. 10 224; Denoya, Ardanaz, Sancho, Benítez, González y Guidi, 2012, p. 264).

Los agentes reductores son sustancias capaces de transformar o- quinonas en compuestos fenólicos. Estos agentes reductores pueden disminuir la velocidad de oxidación y, así permitir la prolongación del alimento. La enzima puede ser inactivada con tratamiento calórico; sin embargo, no es aplicable para todos los alimentos y materias vegetales debido al cambio en la textura y el sabor (Bolaños et al., 2003, p. 40).

1.2.3.2 Agentes anti pardeamiento

La actividad microbiana es una de las principales maneras en las que los alimentos se deterioran, y es responsable de la pérdida de calidad de estos. La preocupación sobre los microorganismos en alimentos es cada vez mayor, debido a las enfermedades que se transmiten a los seres humanos y los peligros que acarrea.

Actualmente, existe gran interés en emplear sustancias antibacteriales de origen natural, como extractos de plantas o especias para la preservación de alimentos, como estos poseen un sabor característico y además, demuestran poder antioxidante a más del antimicrobiano (Jayaprakasha et al., 2003, p. 117).

Existen inhibidores de la polifenol oxidasa, como: sulfitos, hidrógenosulfitos y dióxido de azufre. No obstante, se prefiere no utilizar estos inhibidores debido al posible desarrollo de reacciones alérgicas. Por esta razón, en la actualidad, se evalúan otras sustancias, de origen natural, para ser potenciales inhibidores de la acción de la enzima y den la posibilidad de mantener fresco al producto y no afectar las características organolépticas (Denoya et al., 2012, p. 264).

El uso de antioxidantes en los alimentos es una manera de aumentar el tiempo de vida de estos, en especial, alimentos que contienen lípidos. Para este propósito, se ha venido utilizando BHT (butilato hidroxitolueno), y BHA (butilato hidroxianisole), antioxidantes sintéticos que se han restringido por sospechas de ser cancerígenos. Es por esta razón, que se ha incrementado el número de investigaciones sobre antioxidantes naturales, especialmente de origen vegetal (Othman et al., 2007, p. 1 523).

En la elección de un tratamiento para inhibir el pardeamiento enzimático, se considera que los cambios físicos y químicos que ocurran en la materia prima dentro del proceso industrial minimicen la posibilidad de degradación de los compuestos activos, con la finalidad de mantener la calidad, funcionalidad y propiedades organolépticas (Domínguez, 2013, p. 10).

La selección de un agente anti pardeamiento también depende de la materia vegetal a tratarse. A partir de esto, se determinará la concentración y el tiempo de exposición del inhibidor. El método más económico consiste en sumergir la materia vegetal en recipientes llenos de agua a temperatura de ebullición, que contiene el inhibidor, y se conoce como escaldado. Las sustancias más utilizadas para este método son: difenilamina (DPA) y etoxiquín (Hardenburg, Watada y Wang, 1988, p. 43).

2. METODOLOGÍA

En este trabajo se evaluó la extracción de polifenoles de la placenta de cacao, a través de procesos de maceración, sonicación y centrifugación, para su aplicación como potencial agente inhibidor del pardeamiento enzimático. Los datos obtenidos experimentalmente sirvieron para determinar las mejores condiciones de obtención del extracto fenólico y evaluar la posibilidad de inhibición de la actividad de la polifenol oxidasa.

Se utilizaron mazorcas de cacao, que fueron cortadas longitudinal y transversalmente, para separar las semillas y la placenta de cacao. A ésta última se evaluó sus propiedades fisicoquímicas y se determinó la concentración de polifenoles.

Para extraer los compuestos fenólicos de la placenta de cacao, se realizaron ensayos de maceración variando parámetros de concentración de solvente y relación sólido- líquido. Así, se determinaron las condiciones óptimas del proceso de obtención de un extracto de polifenoles a partir de la placenta de cacao.

Para identificar la acción del extracto fenólico obtenido sobre la inhibición del pardeamiento enzimático, se realizaron mezclas de extracto fenólico con un extracto enzimático de manzana y un sustrato, y se analizó la actividad enzimática. Se compararon los resultados de actividad entre la solución que posee extracto fenólico de placenta de cacao, y el que no posee el extracto fenólico.

Con estos resultados, se realizó el diseño del procesamiento considerando el volumen de desechos en el procesamiento de la mazorca de cacao. El sector que se evaluó fue la parroquia El Progreso, en la provincia de El Oro, ya que se produce el 55 % de la totalidad de la producción cacaotera (Llivi-puma Arias, 2013). Este valor se traduce en 4 000 quintales anuales de cacao, y resulta el fruto más importante para

ese sector. Finalmente, a partir del diseño del proceso de obtención de extracto, se evaluaron los costos directos de este proceso (p. 26).

2.1 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO- QUÍMICAS DE LA PLACENTA DE CACAO

En la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de la placenta de cacao, se determinó el pH, los sólidos solubles (°Brix), la acidez, el porcentaje de humedad y el contenido de polifenoles. Para esto, se siguieron métodos AOAC y de bibliografía relacionada, que se describen a continuación.

2.1.1 DETERMINACIÓN DE PH

Para la determinación de este parámetro, se realizó el procedimiento que se describe en el método AOAC 981.12, con el empleo de un pHmetro (CONSORT, modelo C832). Se tomó la placenta de cacao extraída de la mazorca, se envolvió en tela y se exprimó el jugo en un vaso de precipitación de 100 mL. Enseguida, dentro de un baño termostático, se colocó la muestra hasta que esta alcanzara los 25 °C. Se introdujo el electrodo y se midió el pH. Se repitió dos veces el procedimiento con la placenta a usarse cada semana de ensayos.

2.1.2 DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES (°BRIX)

La determinación de la cantidad de sólidos solubles, o °Brix, se realizó directamente con un refractómetro. Se utilizó el jugo exprimido de la placenta detallado en la

sección 2.1.1. Se colocó una gota de muestra en el refractómetro y se orientó hacia la luz.

2.1.3 DETERMINACIÓN DE ACIDEZ

Se tuvo como referencia el método AOAC 942.15 para la medida de acidez de la placenta de cacao. Se utilizó el jugo exprimido de la placenta detallado en la sección 2.1.1, se procedió a titular el jugo con una solución de hidróxido de sodio, NaOH, 1 N. Se obtuvo el volumen gastado. Por último, se calculó la acidez titulable mediante la ecuación 2.1.

$$\text{Acidez} = \frac{V_g * N}{m} * 100 \quad [2.1]$$

Donde:

Acidez:	Acidez titulable (mEq/100g)
V _g :	Volumen de hidróxido de sodio gastado (ml)
m:	Peso de la muestra (g)
N:	Normalidad de la solución de hidróxido de sodio (eq/L)

2.1.4 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE HUMEDAD (%H)

El porcentaje de humedad se obtuvo a través del procedimiento del método AOAC 31.1.02. Se efectuó el análisis por duplicado. Se colocaron dos cajas Petri con sus tapas dentro de una estufa (BLUE M) por 1 h a 105 °C. Empleando pinzas, se trasladaron las cajas Petri al desecador y se dejaron enfriar durante 30 min. Se pesaron las cajas con tapa; a este peso se lo registró como m₀. Se pesaron 5 g de

placenta sobre cada caja Petri, m_1 . Se colocó la muestra con la caja destapada y la tapa en la estufa a 105 °C por 5 h. Se tapó la muestra, se sacó de la estufa y, por 30 min, se dejó enfriar dentro del desecador. Se pesó y se determinó el peso de la muestra seca, como m_2 . Finalmente, se calculó el porcentaje de humedad utilizando la ecuación 2.2.

$$\%H = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} * 100 \quad [2.2]$$

Donde:

- $\%H$: Porcentaje de humedad en base húmeda (%)
- m_1 : Peso de caja Petri con tapa y muestra húmeda (g)
- m_2 : Peso de caja Petri con tapa y muestra seca (g)
- m_0 : Peso de caja Petri con tapa (g)

2.1.5 DETERMINACIÓN DE CONTENIDO DE POLIFENOLES

Se utilizó el método descrito en Georgé et al. (2005) para determinar el contenido de polifenoles. Se utilizó el jugo exprimido de placenta de cacao cuyo método de obtención se encuentra detallado en la sección 2.1.1. Al tratarse de un jugo que no es turbio, se sigue el procedimiento detallado a continuación (p. 1 370).

2.1.5.1 Equipos y reactivos

El equipo empleado para la determinación de compuestos fenólicos fue un espectrofotómetro UV- visible (SHIMADZU, modelo UV-160A), con celdas de cuarzo de 2 mL. Además, se utilizó un baño termostático (PRECISION SCIENTIFIC, modelo

25) para acondicionar la muestra y un agitador vórtex (VORTEX MIXER, modelo VM-300).

Los reactivos empleados en la determinación del contenido de compuestos fenólicos fueron: Folin- Ciocalteu (2N, Sigma- Aldrich), ácido gálico para la preparación de las soluciones estándar (grado analítico, Merck), carbonato de sodio (grado analítico, Merck), y metanol (grado analítico, Merck).

2.1.5.2 Protocolo de Folin- Ciocalteu

Se inició el procedimiento al preparar una solución de ácido gálico de 500 ppm. Para esto, se pesaron 25 mg de ácido gálico, se disolvió esta cantidad con tres gotas de metanol y se aforó a 50 mL con agua destilada. A esta solución se la llamó solución madre.

Se diluyó esta solución madre entre 10- 100 ppm para la preparación de soluciones de concentración estándar para la elaboración de la curva de calibración. De cada dilución se tomaron 500 μ L y, como blanco, se utilizaron 500 μ L de agua destilada, para proceder con el protocolo de Folin- Ciocalteu (Georgé et al., 2005).

Se colocó el blanco y se encendió el espectrofotómetro. Se realizó la lectura de la absorbancia de las diluciones preparadas a 760 nm. Con estos valores, se realizó un gráfico absorbancia versus concentración y se obtuvo la curva de calibración.

A continuación, se evaluó la placenta de cacao al utilizar el jugo exprimido de esta, cuyo método de obtención se encuentra detallado en la sección 2.1.1.

Primero, se tomó una alícuota de 100 μ L del jugo de placenta exprimido con 9,9 mL de agua destilada. A partir de esta dilución, se tomó una alícuota de 500 μ L con la ayuda de una micropipeta, y se colocó este volumen en un tubo de ensayo.

Se agregaron al tubo de ensayo 2,5 mL de la solución Folin, preparada al diluir, en relación 1/10, el reactivo Folin- Ciocalteu. Inmediatamente, se agitó en el vórtex y, sobre una gradilla, se dejó en reposo por un lapso de 2 minutos, a temperatura ambiente. Al terminar este tiempo, se colocaron 2 mL de la solución de carbonato de sodio, que se preparó al disolver 75 g de carbonato de sodio en un litro de agua. Nuevamente, se agitó en el vórtex, y se dejó el tubo dentro del baño termostático a una temperatura de 50 °C, por 15 min.

Se introdujo a un baño de hielo, y se preparó el espectrofotómetro para la lectura de absorbancia. Se utilizó celdas de cuarzo de 2 mL para la lectura. Únicamente, de este volumen, se encontró en material de cuarzo. Se registró el valor de absorbancia a una longitud de onda de 760 nm, con el blanco respectivo.

El cálculo de la concentración de polifenoles a partir de los datos registrados entregó resultados expresados como mg de equivalente de ácido gálico (EAG)/g de placenta de cacao. Cada análisis se realizó con tres repeticiones. Un ejemplo de cálculo se muestra en el Anexo II.

2.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE POLIFENOLES A PARTIR DE LA PLACENTA DE CACAO

2.2.1 MATERIA PRIMA

Se empleó placenta de cacao extraídas de mazorcas de cacao provenientes de la parroquia El Progreso, en la provincia de El Oro. Las mazorcas fueron trasladadas al Laboratorio de Extractos Vegetales, donde se lavaron y almacenaron en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente.

Se utilizó un cuchillo de hoja ancha para realizar dos cortes: longitudinal y transversal a la mazorca. Inmediatamente separada la placenta de la mazorca de cacao, ésta fue cortada y triturada en el molino de cuchillas. A continuación, se pasó por un tamiz de abertura de 2 mm y se almacenó en refrigeración (4 °C) hasta su utilización por un tiempo máximo de 2 días después de su preparación.

2.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

La determinación de las mejores condiciones para el proceso de obtención del extracto de polifenoles a partir de placenta de cacao, se estableció un diseño experimental de 3^2 , con dos repeticiones del mismo. En la siguiente sección, se definieron las variables del diseño, y la variable de respuesta.

2.2.2.1 Variables del diseño

- **Concentración del Solvente**

La selección de los solventes se realizó tomando en cuenta que la aplicación del extracto es sobre productos alimenticios, por lo tanto, se debe utilizar solventes naturales y nada agresivos para el ser humano. Además, como señala Sharapin (2000), si se requiere obtener la mayor parte de componentes activos, se recomienda utilizar solventes de alta polaridad. Es así que se eligió solventes acuosos de alcohol etílico (etanol) en concentraciones del 0 %, 50 %, y 75 % (p. 35).

- **Relación Sólido: Líquido**

Al no existir estudios previos específicos de la extracción de compuestos activos de la placenta de cacao, se tomó la recomendación de Sharapin (2000) de utilizar bajas relaciones planta/solvente para obtener un mayor contenido. Se fijaron las relaciones sólido: líquido 1:2, 1:4 y 1:8 (p. 41).

- **Variable de respuesta**

La variable de respuesta establecida en el diseño fue la concentración de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto de placenta de cacao.

2.2.3 PROCESO PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA PLACENTA DE CACAO

La metodología de extracción que se designó para este proceso fue la maceración empleando un solvente, con agitación magnética constante, y a temperatura ambiente.

Inicialmente, se pesaron 10 g de placenta fresca molida y tamizada en una malla de 2 mm, en erlenmeyers de 125 mL de capacidad. Sobre la placenta, se adicionó el solvente acuoso de etanol en la concentración y relación sólido- líquido correspondiente a cada tratamiento del diseño experimental.

A continuación, se colocaron agitadores magnéticos de 2,5 a 3 cm de largo, y se tapó el erlenmeyer con la muestra utilizando papel film. Se maceró en la plancha de agitación (VARIOMAG Multipoint, HP 15) a 900 rpm. Se realizaron pruebas de extracción por 20 min, 1 h, 3 h, 6 h y 24 h. Estas pruebas se hicieron en erlenmeyers individuales; es decir, se tuvo un erlenmeyer de 125 mL de capacidad con 10 g de placenta molida y tamizada junto a la cantidad de solvente correspondiente, que se maceró durante el lapso de tiempo designado en las pruebas de extracción. Con la totalidad de la muestra en el erlenmeyer, se trabajó en las siguientes etapas de ensayo.

A cada una de las muestras, después de la maceración, se le llevó a un baño ultrasónico (BRANSON, 3210) por 20 min. Completado este tiempo, se colocó el contenido de cada erlenmeyer en tubos de centrifuga; se utilizó la centrifuga (THERMO) a 3 000 rpm por 10 min.

El sobrenadante se filtró al vacío por papel filtro Whatman No. 40 empleando una bomba de vacío (BÜCHI VAC, V-500). Inicialmente, se colocó un filtro plástico Bücher sobre un kitasato. Luego, se ubicó el papel filtro dentro del filtro plástico, y se procedió a filtrar. Se midió el volumen filtrado y se identificó como extracto fenólico.

En la Figura 2.1, se observa un esquema de la metodología experimental seguida en este proyecto para la obtención de extracto fenólico a partir de la placenta de cacao.

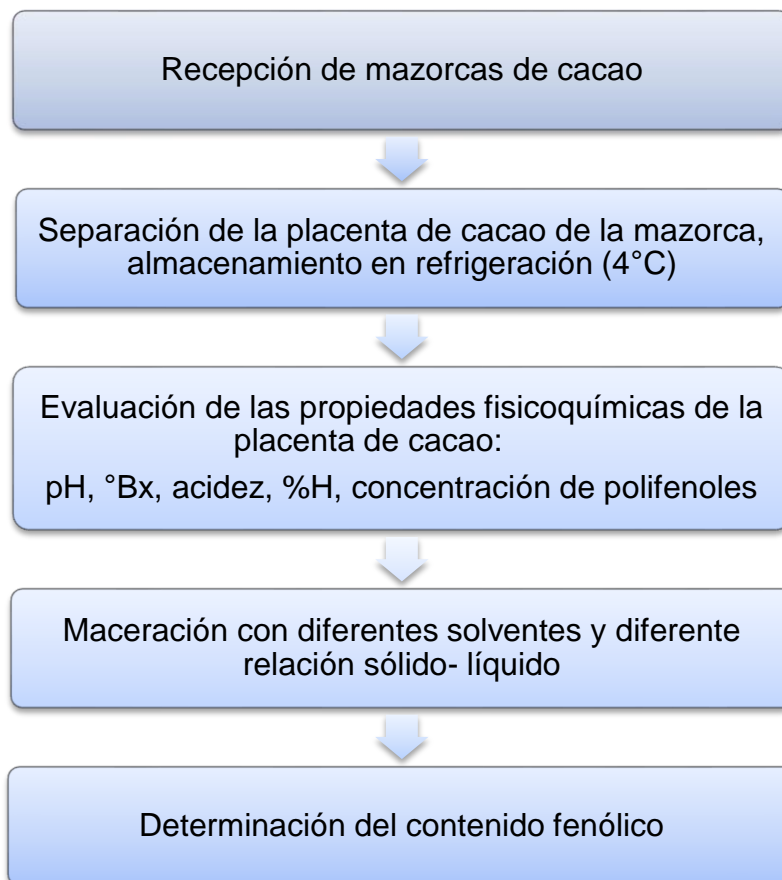


Figura 2.1 Esquema de la metodología experimental del proyecto

2.2.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES DE LOS EXTRACTOS FENÓLICOS DE PLACENTA DE CACAO

Para este fin, se empleó el método descrito en Georgé et al. (2005). Los extractos de placenta siguieron el procedimiento detallado en la sección 2.1.5. Dentro de este procedimiento, se tomó un volumen de 100 μL , con una micropipeta, del extracto

fenólico obtenido en la sección 2.2.3 con 9,9 mL de agua destilada. A partir de esta dilución, se siguió la metodología explicada en la sección 2.1.5 (p. 1 370).

A los extractos obtenidos del proceso, se les evaluó la concentración de polifenoles y se determinó el rendimiento de extracción al comparar el contenido fenólico del extracto frente al de la placenta fresca de cacao, y el rendimiento del extracto. El rendimiento de extracción se calculó con la ecuación 2.3.

$$\eta = \frac{C_n \times V_n}{C_o \times m_o} \quad [2.3]$$

Donde:

- η : Rendimiento de extracción (ml de extracto obtenido/g placenta utilizada)
- C_n : Concentración de polifenoles de la muestra evaluada (mg EAG/g placenta)
- V_n : Volumen de extracción de la muestra evaluada (ml)
- C_o : Concentración de polifenoles de placenta de cacao (mg EAG/g placenta)
- m_o : Masa de placenta de cacao usada en la extracción (g placenta)

Se escogió el extracto que, además de tener mayor contenido fenólico, obtuvo el mayor rendimiento de extracción.

El rendimiento del extracto se calculó con la ecuación 2.4. A través de este cálculo se aprecia la relación del volumen de extracto fenólico obtenido y la masa de placenta utilizada.

$$\eta_e = \frac{V_e}{m_o} \quad [2.4]$$

Donde:

- η_e : Rendimiento del extracto

V_e : Volumen del extracto obtenido (ml)

m_o : Masa de placenta de cacao usada en la extracción (g)

Se realizó un análisis estadístico con el programa STATGRAPHICS Centurion. De esta manera, se determinó el efecto de la concentración de solvente y la relación sólido- líquido sobre la cantidad de compuestos fenólicos extraídos de la placenta de cacao. Adicionalmente, se determinó la diferencia entre las condiciones de operación escogidas en cada ensayo a través de la evaluación de la concentración de compuestos fenólicos; así fue posible establecer la mejor condición de operación del proceso.

Se realizó, además, un análisis de varianza, ANOVA, de los factores propuestos, con la finalidad de observar si hay efectos significativos sobre la concentración de polifenoles. Posteriormente, se realizó una prueba de rangos múltiples para determinar entre qué niveles de las variables existieron diferencias significativas.

A partir de la información obtenida, se escogieron los dos extractos fenólicos que lograron el mayor contenido de polifenoles y un alto rendimiento de extracción, para la evaluación de la inhibición de la polifenol oxidasa.

2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO FENÓLICO DE PLACENTA DE CACAO EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE POLIFENOLOXIDASA

En esta sección, se utilizaron los dos extractos fenólicos obtenidos en la sección 2.2, que alcanzaron la mayor concentración de polifenoles y el mayor rendimiento de extracción. Para determinar la actividad inhibitoria del extracto fenólico, se preparó un extracto enzimático, y se observó el cambio en la actividad del extracto enzimático con la presencia del extracto fenólico.

2.3.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE MANZANA

Este extracto es obtenido a partir de manzana roja de poca maduración del tipo Gala, y se preparó basado en el método descrito en Bravo, Muñoz, Calderón y Osorio, 2011.

Se lavaron las manzanas con agua y jabón, y se pesaron 20 gramos. Se homogenizó la fruta con 40 mL de buffer fosfato 0,1 M, a un pH de 6,5. A este jugo se le adicionó una solución de Tritón X-100 (grado analítico, Merck), al 1,5 % en buffer fosfato pH 6.5 (Muñoz, Bravo, Zapata Ocampo y Londoño, 2007, p. 162).

El jugo obtenido fue filtrado sobre gasa, se colocó en un tubo de centrifuga y se llevó a 1 250 x g durante 20 min a una temperatura de 4 °C. Se logró la separación de precipitado y sobrenadante. Este último fue sonificado por 45 min y luego se centrifugó a 3 200 x g por 60 min.

Se añadió acetona en proporción 1:2 de sobrenadante: acetona, y se llevó a la centrifuga. Se estableció una velocidad de 3200 x g durante 25 minutos y una temperatura igual a 4°C. El sobrenadante se desechó y el precipitado se suspendió en 1 mL del mismo buffer fosfato que se empleó al inicio de la extracción (Muñoz et al., 2007, p. 162).

2.3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO FENÓLICO

En esta sección, se determinó la actividad inhibitoria del extracto fenólico a través del cambio en la actividad del extracto enzimático preparado en la sección 2.3.1, cuando se le colocó el extracto fenólico.

Para esto fue necesario preparar un sustrato y tres soluciones: solución control, solución referencia y solución muestra, como se describe a continuación.

Primero, se preparó el sustrato disolviendo tirosina 40 mM en buffer fosfato de concentración 0,2 M, a un valor de pH de 6. A continuación, se prepararon tres soluciones: control, referencia, y muestra, de la siguiente manera:

- La solución control o blanco fue preparada mezclando 480 μ L de sustrato, 480 μ L de etanol 50 % y 40 μ L buffer fosfato. Se utilizó para inicializar el espectrofotómetro.
- La solución referencia se obtuvo al mezclar 480 μ L de sustrato, 480 μ L de etanol 50 % y 40 μ L de extracto enzimático de manzana.
- La solución muestra se formó al combinar 480 μ L de sustrato, 480 μ L de extracto fenólico de placenta y 40 μ L de extracto enzimático de manzana.

A cada una de estas soluciones se les llevó al espectrofotómetro para medir la absorbancia. La actividad de la polifenol oxidasa se determinó por un incremento en la absorbancia medida a 400 nm de longitud de onda. La duración del ensayo fue 10 minutos. Esta actividad corresponde a la medida de la velocidad de formación de quinonas a 25 °C. Se consideró una variación de la absorbancia de 0,001 por minuto como una unidad de actividad de polifenol oxidasa (Muñoz et al., 2007, p. 162).

Se determinó el número de unidades de actividad de polifenol oxidasa a partir del gráfico de absorbancia versus tiempo. Además, se calculó el porcentaje de inhibición del extracto fenólico sobre el extracto enzimático de manzana.

El porcentaje de inhibición se determinó utilizando la ecuación 2.5 presentada por Muñoz et al. (2007) en su investigación acerca de la caracterización de la

polifenoloxidasas en frutas tropicales, donde prueba la inhibición de la polifenoloxidasas en un extracto enzimático de manzana (p. 163).

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{m_x}{m_b}\right) \times 100 \quad [2.5]$$

Donde:

m_x : Valor de la pendiente de la recta trazada para cada extracto enzimático de manzana a evaluar

m_b : Valor de la pendiente de la recta trazada para cada extracto fenólico de placenta de cacao a evaluar

Se escogió el extracto que consiguió el mayor porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasas, ya que, la aplicación del extracto obtenido en este proyecto está relacionada completamente a la inhibición del pardeamiento enzimático.

Adicionalmente, se determinó la cantidad de extracto fenólico que se necesitaría para inhibir el pardeamiento enzimático de un kilogramo de manzana, que es la fruta en la que se evaluó el extracto.

2.4 DISEÑO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA PLACENTA DE CACAO A PARTIR DE DESECHOS DE PROCESAMIENTO

La realización del diseño del proceso para extraer compuestos fenólicos de la placenta de cacao se realizó tomando en cuenta los resultados de los ensayos experimentales detallados en la sección 2.2 y 2.3.

Este estudio se efectuó para una capacidad de procesamiento de 160 qq por año de placenta de cacao, que equivale al volumen de desechos cuando se procesan 4 000 qq de mazorca de cacao por año. Este valor es el producido en el sector El Progreso, del que se orientó este proyecto debido a que se trata cacao de primera para exportación. Esto implica una gran demanda de mazorcas de cacao y generación de placenta de cacao.

Se realizaron diagramas para establecer la secuencia de operaciones unitarias. Estos diagramas fueron: de bloques (BFD) y de proceso (PFD). La finalidad fue enlistar los equipos necesarios en el proceso, y determinar sus especificaciones técnicas.

Adicionalmente, se identificó el flujo másico de cada corriente que interviene en el proceso, en kilogramos por día. El balance de masa realizado permitió determinar la cantidad de extracto fenólico producido.

2.5 EVALUACIÓN DE LOS COSTOS DIRECTOS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA PLACENTA DE CACAO

Se realizó la evaluación de los costos directos del proceso, que involucran los equipos planteados en la sección 2.4. El proceso tomó en cuenta la capacidad de procesamiento de 160 qq por año de placenta de cacao, o 66,67 kg de placenta por día, al igual que en el diseño del proceso.

Los parámetros a evaluar dentro de los costos directos fueron varios como el costo de los equipos principales del proceso, requerimiento y costo de tuberías y el requerimiento de instrumentación. Se utilizó criterios de estimación de costos de

referencias bibliográficas. Se reportaron los equipos de mayor costo y la manera en que se podría reducir el costo de compra.

Con base en el resultado de la cantidad de extracto fenólico producido y el total de los costos directos, se pudo determinar el costo de producción de un kilogramo de extracto. Además, se comparó el costo del extracto fenólico con el costo de una pulpa de fruta (manzana), para indicar el porcentaje de influencia sobre el valor de la pulpa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se reportan los resultados que se obtuvieron en los ensayos experimentales, correspondientes a la caracterización físico- química de la placenta de cacao, la obtención de las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos a partir de placenta de cacao, y la evaluación de la posibilidad de inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa. Se determinó el diseño del proceso para el tratamiento de 66,67 kg por día de placenta de cacao y se evaluaron los costos directos de este proceso.

3.1 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LA PLACENTA DE CACAO

A continuación, se muestran los datos registrados de las propiedades físico-químicas que se evaluaron para la placenta de cacao, con la metodología planteada en la sección 2.1.

Es importante tomar en cuenta que la literatura científica es reducida con respecto a las características físicoquímicas de la placenta de cacao. Esta parte de la mazorca del cacao es tratada como desecho en el procesamiento de las almendras de cacao y resulta poco relevante a nivel industrial.

3.1.1 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE PH

Las pruebas de evaluación de pH de la placenta se realizaron por duplicado, por dos semanas. Se registraron cuatro medidas de pH de placenta de cacao en total. Los resultados obtenidos se reportan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Resultados de pH obtenidos para la placenta de cacao

Semana	Muestra de placenta	pH	Promedio
1	1	3,56	3,54 ± 0,04
	2	3,58	
2	3	3,49	
	4	3,52	

 $\bar{x} \pm \sigma$

Como se puede observar en la Tabla 3.1, la placenta de cacao mostró un pH de 3,54, un valor ácido. El valor de pH reportado no es cercano al valor presentado en Quimbita, Rodríguez y Vera (2013) (pH: 4,41). Esta variación pudo darse por varios factores como el tipo de mazorca de cacao empleado en el análisis de las propiedades fisicoquímicas, el estado de madurez de la mazorca y las condiciones de preparación de la muestra para la medición (p. 13).

En Quimbita et al. (2013), se utilizaron mazorcas de CCN51 (Colección Castro Naranjal), y en esta investigación se emplearon mazorcas de cacao Nacional. Villavicencio (2001) menciona que el cacao de variedad CCN51 tiende a presentar un pH más alto que el cacao de variedad Nacional (p. 9; p. 58).

El intervalo de pH que presenta Ohene (2014) en su libro es 3,3 a 4, referente a la pulpa de la mazorca de cacao sin fermentar. Estos datos reportados son similares al valor de pH obtenido en el desarrollo de este trabajo, lo que señala la posibilidad de que la muestra de placenta, preparada con la metodología de la sección 2.1.1, tenga propiedades similares a la pulpa de la mazorca de cacao (p. 261).

Adicionalmente, en Quimbita y Rodríguez (2008) se realizó una evaluación del pH cuando se mezcla el jugo de placenta con el exudado de cacao (pH: 3,67). Este valor es aún más cercano al obtenido en esta investigación. Esto puede implicar que pudo también haber ocurrido la mezcla entre el exudado de cacao con el jugo de la placenta que se evaluó (p. 98).

3.1.2 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES (°BRIX)

En la Tabla 3.2, se presentan los valores de sólidos solubles obtenidos en las pruebas para la placenta de cacao. Estas pruebas se realizaron por duplicado, por dos semanas.

Tabla 3.2 Resultados de sólidos solubles (°Brix) obtenidos para la placenta de cacao

Semana	Muestra de placenta	°Brix	Promedio
1	1	13,80	13,83 ± 0,03
	2	13,85	
2	3	13,85	
	4	13,80	

$\bar{x} \pm \sigma$

De la Tabla 3.2, se tiene que el valor medio de °Brix obtenido para la placenta de cacao es 13,83. Si se compara este valor con el de frutas como la piña, que tiene alrededor de 12,5 °Brix, la placenta de cacao es alta en azúcares solubles (Baraona y Sancho, 1991, p. 34).

El resultado de sólidos solubles de la placenta de cacao para esta investigación es mayor que el reportado por Quimbita et al. (2013) (°Brix: 12,4), sin embargo, se trata de valores de sólidos solubles altos (p. 13).

En la caracterización de las partes del cacao, Graziani, Ortiz y Parra (2003), en su estudio acerca de la pulpa y recubrimiento de semillas de cacao, obtuvieron valores de °Brix alrededor de 13,43. Esta cantidad es muy cercana a la reportada en este trabajo, probablemente es debido a la similitud del recubrimiento de las semillas con la placenta de cacao (p. 138).

3.1.3 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE ACIDEZ

Los datos obtenidos de la evaluación de la acidez titulable se muestran en la Tabla 3.3. Se realizaron pruebas por duplicado, por un período de dos semanas. El resultado se reportó en porcentaje de ácido.

Tabla 3.3 Resultados de acidez titulable obtenidos para la placenta de cacao

Semana	Muestra de placenta	Acidez (% ácido cítrico)	Promedio
1	1	0,84	0,86 ± 0,02
	2	0,88	
2	3	0,88	
	4	0,85	

$\bar{x} \pm \sigma$

El valor medio de acidez titulable obtenido para la placenta de cacao es mayor al valor de acidez presentado en Quimbita et al. (2013) (acidez: 0,8). Además, el valor de acidez para la placenta de cacao resulta alto, esto puede implicar que la mazorca de donde se extrajo la placenta, haya estado poco madura (p. 58).

En Delhom (1985) se demuestra que, si se consigue una buena relación entre el valor de acidez y °Brix, y este valor es alto, la fruta estaría en condiciones para cosecharse. Adicionalmente, según Villavicencio (2001), la variación de acidez puede también estar gobernada por la diferencia en la composición de la pulpa (p. 13; p. 12).

Un valor de pH bajo, como se mostró en la Tabla 3.1, y un valor alto de acidez, se deben, en mayor parte, a la presencia de algunos ácidos como el ácido cítrico y el ácido acético. Estos ácidos preservan el color, sabor y características organolépticas, y previenen la contaminación bacteriana, según Navarre (2010, p. 204).

3.1.4 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

Dentro de este acápite, en la Tabla 3.4, se muestran los porcentajes de humedad de la placenta de cacao que se registraron durante la evaluación. Se reportaron datos de las pruebas realizadas por duplicado, para las dos semanas en donde se determinó esta propiedad.

Tabla 3.4 Resultados del porcentaje de humedad obtenidos para la placenta de cacao

Semana	Muestra de placenta	Humedad (%)	Promedio
1	1	68,72	69,1 ± 0,32
	2	69,46	
2	3	68,94	
	4	69,18	

$\bar{x} \pm \sigma$

El valor medio de porcentaje de humedad muestra que la placenta de cacao posee gran cantidad de agua en su sistema. Un valor de 77,7 % se presenta en el estudio de Quimbita et al. (2013), lo que sugiere que la cantidad de humedad de la placenta pueda depender del tipo de cacao utilizado para el análisis. Además, al analizar el porcentaje de humedad de las almendras de cacao, que poseen un porcentaje de humedad aproximado al 60 % (Ortiz, Camacho y Graziani, 2004), se puede determinar que tienen valores similares (p. 7; p. 1).

3.1.5 RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES EN LA PLACENTA DE CACAO

Se realizaron pruebas experimentales con la placenta de cacao, por duplicado y por dos semanas, para poder determinar la concentración de compuestos fenólicos. Se registraron los resultados dentro de la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Resultados del contenido de compuestos fenólicos en la placenta de cacao

Semana	Muestra de placenta	Concentración de polifenoles (mg EAG/g placenta)	Promedio
1	1	60,25	61,07 ± 0,79
	2	61,89	
2	3	60,56	
	4	61,58	

 $\bar{x} \pm \sigma$

Con base en estos registros, se comparó la concentración de compuestos fenólicos de la placenta de cacao, con la del cacao presentada por Padilla et al., que es 66,6 mg EAG/g; se puede observar la cercanía de los valores. Además, en su estudio compara el contenido fenólico de las semillas de cacao con el contenido en semillas de mamón, una fruta agridulce de gran popularidad por sus beneficios para la salud, y resulta que el cacao tiene la mayor cantidad de compuestos fenólicos (p. 305).

La concentración de polifenoles depende de la madurez del fruto de cacao de donde se extrajo la placenta. Por lo que se recomendaría evaluar placentas de mazorcas de cacao en diferentes estados de maduración (Viñas et al., 2013, p. 191).

Finalmente, la desviación estándar, a partir de los datos reportados cada semana, fue calculada para cada propiedad fisicoquímica. De esta manera, se obtuvieron los siguientes valores: 1,12 %, 0,20 %, 2,32 %, 0,46 %, y 1,29 %, que corresponden a la desviación estándar de la evaluación de pH, °Brix, acidez, porcentaje de humedad y concentración de polifenoles, respectivamente. Estos resultados muestran la consistencia entre las medidas reportadas de cada propiedad. El alto porcentaje en desviación estándar responde a la complejidad de tomar la medida de las propiedades fisicoquímicas a partir de la placenta.

3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE POLIFENOLES A PARTIR DE LA PLACENTA DE CACAO

El análisis de las mejores condiciones para el proceso de obtención del extracto de polifenoles a partir de la placenta de cacao, se realizó tomando en cuenta la combinación de variables de diseño experimental que entreguen como resultado el mayor contenido de compuestos fenólicos en el extracto.

Se evaluó el contenido de polifenoles en cada extracto a través del método explicado en la sección 2.2.4. Además, se realizó el cálculo del rendimiento de extracción y de extracto, y un análisis estadístico sobre la influencia de los factores evaluados en la obtención del extracto, como se indicó en el acápite anterior.

3.2.1 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ANÁLISIS DE POLIFENOLES

En la Figura 3.1, se muestra la curva de calibración obtenida con mayor valor de linealidad, 0,999. Se construyó a partir de estándares a diferentes concentraciones de ácido gálico desde 5 a 100 ppm.

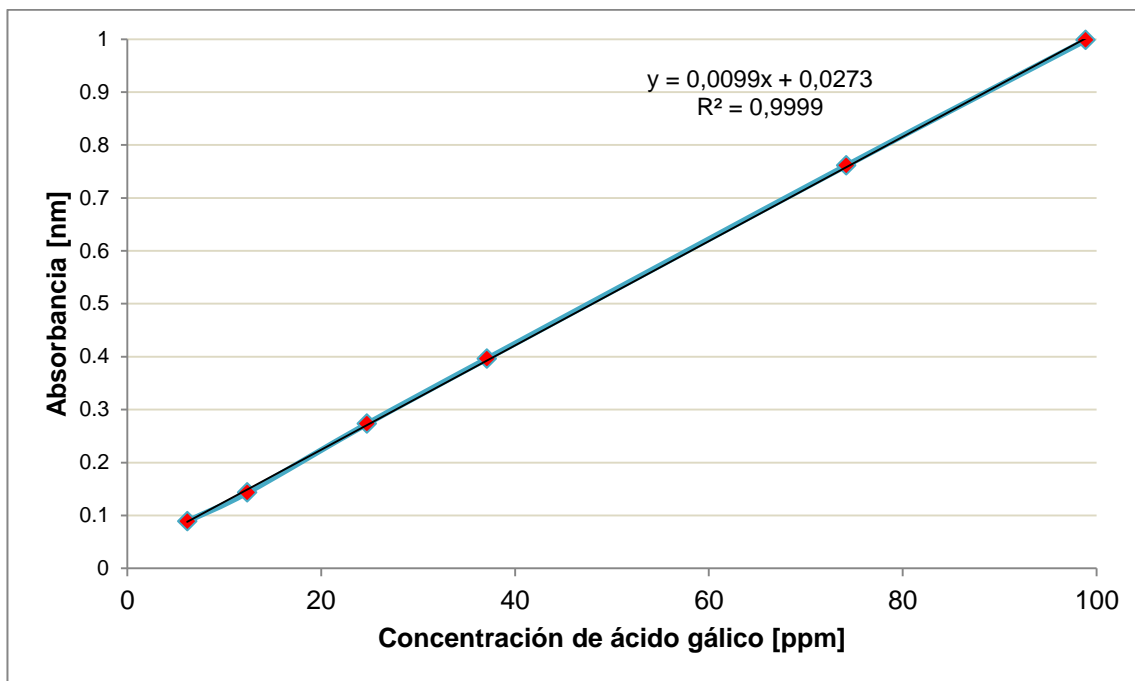


Figura 3.1 Curva de calibración construida a partir de estándares de ácido gálico a concentraciones de 0 a 100 ppm ($\lambda = 760$ nm)

El valor de R^2 correspondiente a la curva de calibración de la Figura 3.1 indica un alto grado de fiabilidad. Además, por la cercanía a un valor de 1, se puede indicar un buen ajuste al modelo lineal, que describe la relación que hay entre estas variables. Con esta ecuación se calcularon las concentraciones de polifenoles en los extractos, tomando en cuenta que no se realizaron diluciones para la determinación del contenido fenólico.

3.2.2 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES

En la Tabla 3.6, se encuentran recopilados los datos obtenidos del cálculo del contenido de compuestos fenólicos totales de los extractos de placenta evaluados, en equivalentes de ácido gálico por litro de extracto.

Tabla 3.6 Contenido de polifenoles totales en muestras de extracto de placenta de cacao (equivalentes de ácido gálico por litro de extracto)

Tratamiento	Concentración del solvente (Solución acuosa)	Relación sólido- líquido	Concentración de polifenoles en el extracto (mg EAG/L)	Promedio
1	Etanol 0 %	1:2	2,21	2,47 ± 0,24
2			2,49	
3			2,69	
4		1:4	1,08	1,07 ± 0,03
5			1,04	
6			1,11	
7		1:8	0,281	0,300 ± 0,017
8			0,315	
9			0,304	
10	Etanol 50 %	1:2	31,08	35,15 ± 3,53
11			37,19	
12			37,19	
13		1:4	15,78	15,36 ± 0,82
14			15,89	
15			14,42	
16		1:8	7,50	7,03 ± 0,42
17			6,92	
18			6,68	
19	Etanol 75 %	1:2	29,87	27,79 ± 2,11
20			27,84	
21			25,65	
22		1:4	9,05	9,66 ± 0,56
23			10,16	
24			9,76	
25		1:8	2,69	2,65 ± 0,03
26			2,63	
27			2,63	

$\bar{x} \pm \sigma$

EAG: Equivalentes ácido gálico

En la Tabla 3.6, se reportó la concentración media de polifenoles, pues facilitó la visualización de la diferencia que existe entre los extractos. En la Figura 3.2, se muestran las cantidades en concentración de compuestos fenólicos para los extractos preparados con soluciones acuosas de etanol 0 %, etanol 50 % y etanol 75 %, en términos de mg de equivalentes de ácido gálico por litro.

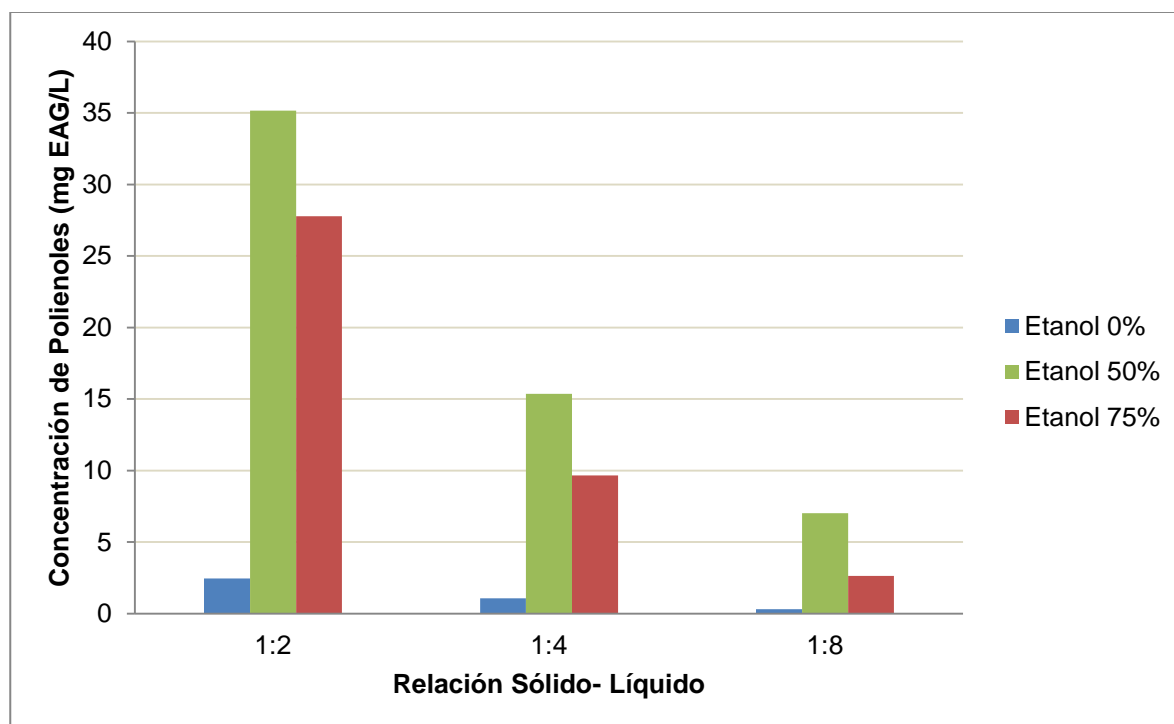


Figura 3.2 Concentración de polifenoles totales extraídos de la placenta de cacao, de las muestras preparadas según el diseño experimental, en relaciones sólido- líquido de 1:2, 1:4, y 1:8, con solventes acuosos: etanol 0 %, etanol 50 % y etanol 75 %

En la Figura 3.2, se observa que existe un valor mayor que los otros en porcentaje de etanol presente en el solvente para cada relación sólido- líquido, donde se consigue la mayor concentración de polifenoles. La relación 1:2 permite alcanzar los valores promedio más altos en cantidad de polifenoles frente a las demás relaciones sólido- líquido evaluadas.

A continuación, se evalúa la influencia de la concentración de solvente y la relación sólido- líquido, de forma individual, con la finalidad de obtener mayor información que permita determinar la mejor condición del proceso.

3.2.2.1 Influencia de la concentración de solvente

Dentro de los ensayos, el solvente que extrajo menor cantidad de polifenoles totales fue el agua. La concentración de solvente que logró mayor cantidad de compuestos fenólicos extraídos fue etanol 50 %.

Sharapin (2000) menciona que el agua es el solvente más común utilizado en mezclas con otros solventes como alcohol etílico y metílico. Con esto, se logra alcanzar una constante dieléctrica que ayuda a la mejor extracción de compuestos de interés. Se habla de mezclas alcohol: agua 7:3 u 8:2, cuando se busca extraer compuestos de las partes leñosas de una planta, raíces y semillas. Por otro lado, se recomienda la proporción 1:1 cuando se extraen compuestos de hojas o partes verdes. Además, para la obtención de la mayor cantidad de compuestos de interés de una parte de la planta, se sugiere utilizar un solvente de alta polaridad. Con estos antecedentes, se eligieron tres concentraciones de solventes acuosos: etanol 0 %, etanol 50 %, y etanol 75 % (p. 42).

Basados en los resultados obtenidos de la concentración de polifenoles en cada extracto de placenta de cacao, los extractos que contienen la mayor cantidad de compuestos fenólicos son los que tienen como solvente una mezcla binaria alcohol: agua.

En Sharapin (2000) se señala que a pesar de tratarse de solventes polares en contacto con compuestos polares, lo cual facilita su extracción, también es

importante tomar en cuenta la influencia de la constante dieléctrica en este proceso (p. 42).

En la Tabla 3.7, se distinguen las constantes dieléctricas de los solventes puros y las mezclas de estos con agua, como se emplearon en esta investigación.

Tabla 3.7 Valores de la constante dieléctrica de los solventes y las mezclas de solventes utilizados en la investigación

Solvente	Constante dieléctrica a 25 °C	Concentración de polifenoles, relación S:L 1:2 (mg EAG/L)
Etanol 0 %	78,3	2,47
Etanol 50 %	51,3	35,15
Etanol 75 %	37,8	27,79
Etanol 100 %	24,3	-

Sharapin (2000), p. 36

Tomando en cuenta los datos de la Tabla 3.7, se denota la existencia de una relación entre la constante dieléctrica del solvente y la concentración de polifenoles en el extracto, al evaluarse las concentraciones de etanol de 50 % y 75 %. Esta relación no es lineal, si se analiza la constante dieléctrica y la concentración de polifenoles con el solvente etanol 0 %. La cantidad de compuestos fenólicos extraídos parece aumentar cuando la constante dieléctrica es elevada; sin embargo, esta relación no se mantiene. Es así que el mayor valor de este parámetro (78,3) no implicó la obtención de la mayor concentración de polifenoles.

Además, se tiene que el mayor valor de concentración de polifenoles se obtiene al utilizar etanol 50 %, cuya constante dieléctrica es 51,3. Puede suponerse que cuando la constante dieléctrica del solvente disminuye, se logra extraer mayor cantidad de polifenoles. Se recomienda ampliar el rango de estudio de la cantidad de etanol en la mezcla alcohol: agua, ya que se podría obtener un valor mayor de concentración de polifenoles con un porcentaje de etanol entre 0 y 50 %.

Sharapin (2000) menciona que las mezclas entre dos líquidos solventes son las más adecuadas para la obtención de compuestos fenólicos. En la Figura 3.2, se distingue que las muestras preparadas con etanol 75 % no alcanzan a extraer mayor cantidad de polifenoles, y puede deberse a la disminución de la constante dieléctrica (p. 254).

Además, Mirzapour et al. (2012) en su investigación extrae polifenoles totales utilizando como solventes mezclas alcohol- agua y en el resultado afirma que cuando el alcohol tiene un porcentaje en volumen menor al 60 %, la extracción se incrementa. Al contrario, si el porcentaje en volumen de alcohol es mayor al 60 %, la extracción de polifenoles totales disminuye. Esto guarda coherencia con los resultados obtenidos, por lo que se concluye que el solvente aconsejable para una mejor extracción de polifenoles totales de la placenta de cacao es el etanol al 50% (p. 29).

Es así que se observó que al aumentar la proporción de agua en el solvente, se conseguía una alta cantidad de compuestos fenólicos en el extracto. Esto expuso la influencia de la polaridad del solvente sobre la concentración de polifenoles extraídos.

El mayor valor se consiguió cuando el porcentaje de etanol estuvo alrededor del 50 %; no obstante, se formó una curva que denotaba un mejor valor de porcentaje de etanol, lo que sugiere una evaluación de la concentración de compuestos fenólicos cuando se utiliza etanol en porcentajes menores al 50 %, pero mayores que 0 %.

3.2.2.2 Influencia de la relación sólido- líquido

Una de las variables que influyen en los procesos extractivos de compuestos fenólicos es la relación sólido- líquido. Como se indicó en la sección 3.2, las características de la materia prima hacen que cada sistema material- solvente sea distinto y que muestre comportamientos diferentes.

Se evaluaron tres niveles para esta variable: 1:2, 1:4, y 1:8. En la Figura 3.2, se aprecia la mayor concentración de polifenoles obtenida al utilizar una relación sólido- líquido de 1:2, el valor es 35,15 mg EAG/L. Este resultado muestra que a menor relación sólido- líquido, se extrae mayor cantidad de compuestos fenólicos de la placenta de cacao.

Pinelo et al. (2005), en su investigación acerca del efecto de la relación sólido- líquido sobre el contenido de polifenoles en pulpa de uva, determina que se logra valores altos de concentración de compuestos fenólicos cuando la relación sólido- líquido o sólido- solvente es más baja (p. 2 114).

Esta afirmación resulta lógica, ya que a menor cantidad de solvente, mayor será la concentración alcanzada en el extracto. Si la extracción se lleva bajo condiciones donde la relación sólido- líquido es elevada, la concentración de polifenoles en el extracto va a ser menor, pues se disuelve en mayor cantidad de solvente; sin embargo, la cantidad total extraída podría incrementarse.

La Tabla 3.8 expone el resultado de la evaluación ANOVA. Se muestra que todos los valores- P son menores a 0,05, asegurando así, que ambos factores tienen influencia estadísticamente significativa sobre la concentración de polifenoles, al igual que su interacción con un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 3.8 Análisis de Varianza (ANOVA) de las condiciones para la concentración de polifenoles en el extracto obtenido de la placenta de cacao

Unidad medida	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón- F	Valor- P
FACTORES PRINCIPALES					
A: Relación Sólido- líquido	1 625,34	2	812,67	403,57	0,000
B: Concentración de Solvente	1 501,27	2	750,63	372,76	0,000
INTERACCIÓN					
AB	643,27	4	160,82	79,86	0,000
RESIDUAL	36,25	18	2,01		
TOTAL (Corregido)	3 806,13	26			

A continuación, se muestran los diagramas de medias resultantes del análisis de varianza (ANOVA) de la concentración de solvente y la relación sólido- líquido, que se estudian en este trabajo, sobre la variable de respuesta correspondiente a la concentración de compuestos fenólicos.

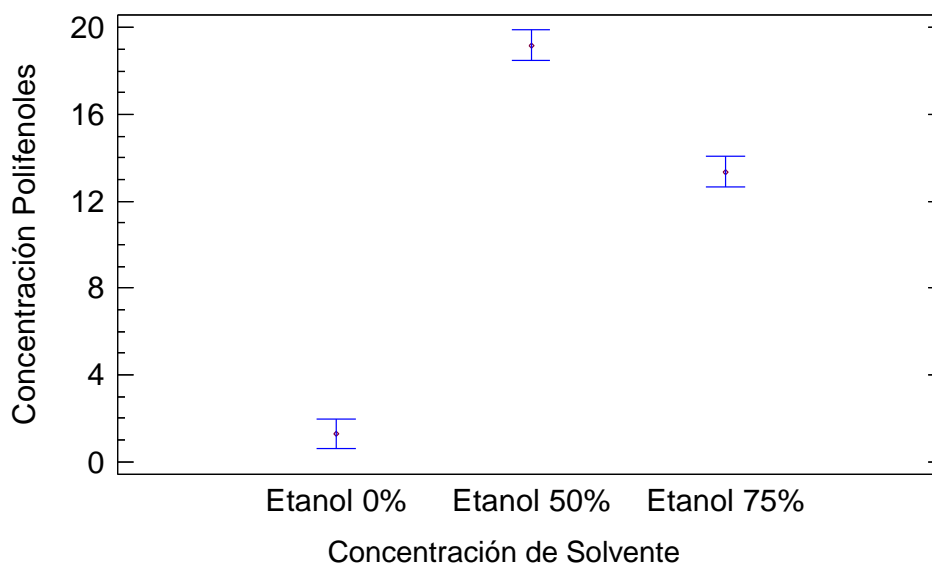


Figura 3.3 Diagrama de medias para la concentración de solvente con intervalo LSD, con el 95 % de confianza

Estas comparaciones se realizaron de manera individual para cada factor, es así que, en la Figura 3.3, se analiza la concentración de solvente, y en la Figura 3.4, se observa la relación sólido- líquido.

La Figura 3.3 muestra que el etanol al 50 % permite la extracción de la mayor concentración de polifenoles. En la Figura 3.4, referente a la relación sólido- líquido, se observa el valor más alto de concentración de polifenoles extraídos cuando la relación es 1:2. No obstante, es importante resaltar el máximo valor de concentración de polifenoles alcanzado cuando se evalúa cada uno de los factores por separado.

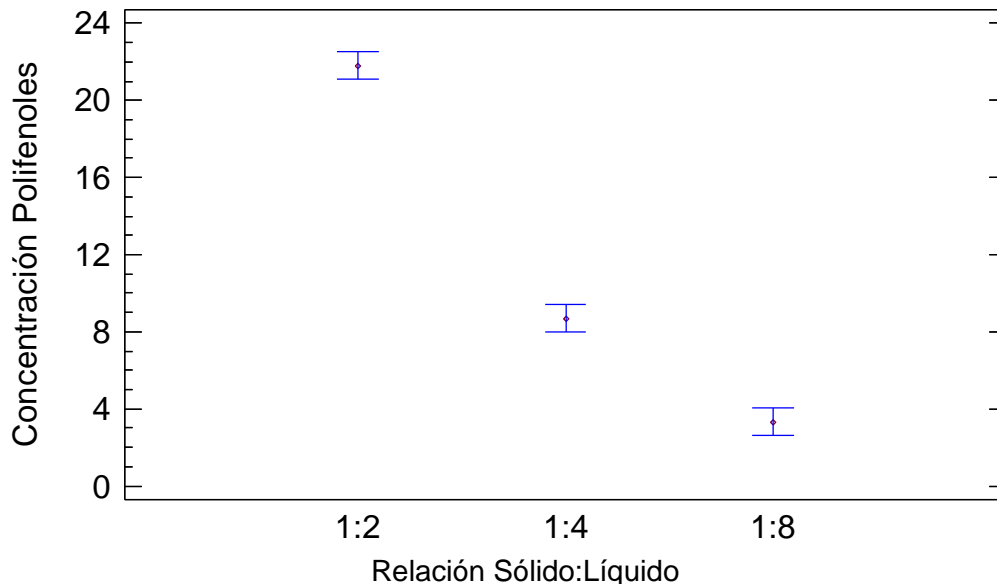


Figura 3.4 Diagrama de medias para la relación sólido- líquido con intervalo LSD, con el 95 % de confianza

En la Figura 3.4, la concentración máxima con el factor de relación sólido- líquido es mayor que la alcanzada con el factor de concentración de solvente, que corresponden a valores 17 y 22, aproximadamente. Por lo tanto, con ambos diagramas, se concluye que el factor que provoca el efecto de mayor influencia en el contenido fenólico es la relación sólido- líquido. Además, es posible obtener el mayor valor de concentración de polifenoles cuando se utiliza etanol 50 % junto a un determinado nivel de relación sólido- líquido. Según toda la información recolectada,

el mejor tratamiento resulta con la relación sólido- líquido 1:2 y el solvente, etanol 50 %; sin embargo, es necesario también analizar el rendimiento de extracción.

3.2.2.3 Rendimiento de extracción

El factor de rendimiento de extracción es relevante, pues da una idea de la cantidad de compuestos fenólicos obtenidos por gramo de placenta utilizado, por lo que se verifica en esta sección, que las condiciones escogidas sean las óptimas. En la Tabla 3.9, se pueden ver los rendimientos de extracción y de extracto de polifenoles de la placenta de cacao. Se evaluó este factor utilizando la ecuación 2.3, expuesta en la sección 2.

En la Tabla 3.9, se reportó el rendimiento del extracto. Los valores más altos alcanzados por este factor se dieron cuando la relación sólido- líquido es 1:8. Esto implica que, aproximadamente, con una cantidad determinada de placenta de cacao, se logra obtener alrededor de 6 veces más de extracto fenólico. Sin embargo, el alto rendimiento del extracto a estas condiciones no logra la mayor concentración de compuestos fenólicos.

Tabla 3.8 Rendimientos de extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao

Concentración de solvente (Solución acuosa)	Relación S: L	Masa de placenta (g)	Volumen extracto (ml)	Rendimiento extracto (η_e)	Rendimiento extracción (η)	Rendimiento medio de extracción (%)
Etanol 0 %	1:2	9,998	11	1,10	5,42E-3	0,645
		9,976	12	1,20	7,29E-3	
		9,931	11	1,11	6,65E-3	
	1:4	9,839	18	1,83	7,18E-3	0,706
		10,101	18	1,78	6,74E-3	
		9,990	18	1,80	7,25E-3	
	1:8	9,995	61	6,10	2,12E-2	2,387
		10,041	61	6,07	2,37E-2	
		10,138	63	6,21	2,41E-2	
Etanol 50 %	1:2	10,160	14	1,38	0,142	14,57
		10,085	14	1,39	0,146	
		9,921	14	1,41	0,149	
	1:4	10,159	32	3,15	0,322	32,382
		9,873	31	3,14	0,313	
		10,023	34	3,39	0,336	
	1:8	10,873	59	5,43	0,486	48,028
		10,001	58	5,80	0,471	
		10,053	60	5,97	0,484	
Etanol 75 %	1:2	9,837	12	1,22	0,088	8,164
		10,045	12	1,19	0,081	
		9,877	12	1,21	0,076	
	1:4	10,075	26	2,58	0,123	13,104
		10,004	26	2,60	0,139	
		10,167	26	2,56	0,131	
	1:8	9,996	67	6,70	0,244	23,996
		10,193	67	6,57	0,234	
		10,190	68	6,67	0,247	

 $\bar{x} \pm \sigma$

Es necesario recalcar que, después del procedimiento de centrifugado, no se logró una total separación del extracto y la placenta; por lo que, se obtuvo un volumen de suspensión extracto- placenta, que no pasó al proceso de filtrado. Esta cantidad

influyó en el reporte de cantidad de extracto obtenido, pues lo que debió pasar al proceso de filtrado, se tomó como sedimentos.

Tomando este inconveniente en cuenta, más adelante, en la sección 3.4, se pretende realizar una estimación, donde la relación entre el sobrenadante y el precipitado supuesta durante el ensayo considere el volumen de suspensión perdido. En la Figura 3.5 detallada seguidamente, se presentan los rendimientos promedio de extracción para los tratamientos efectuados.

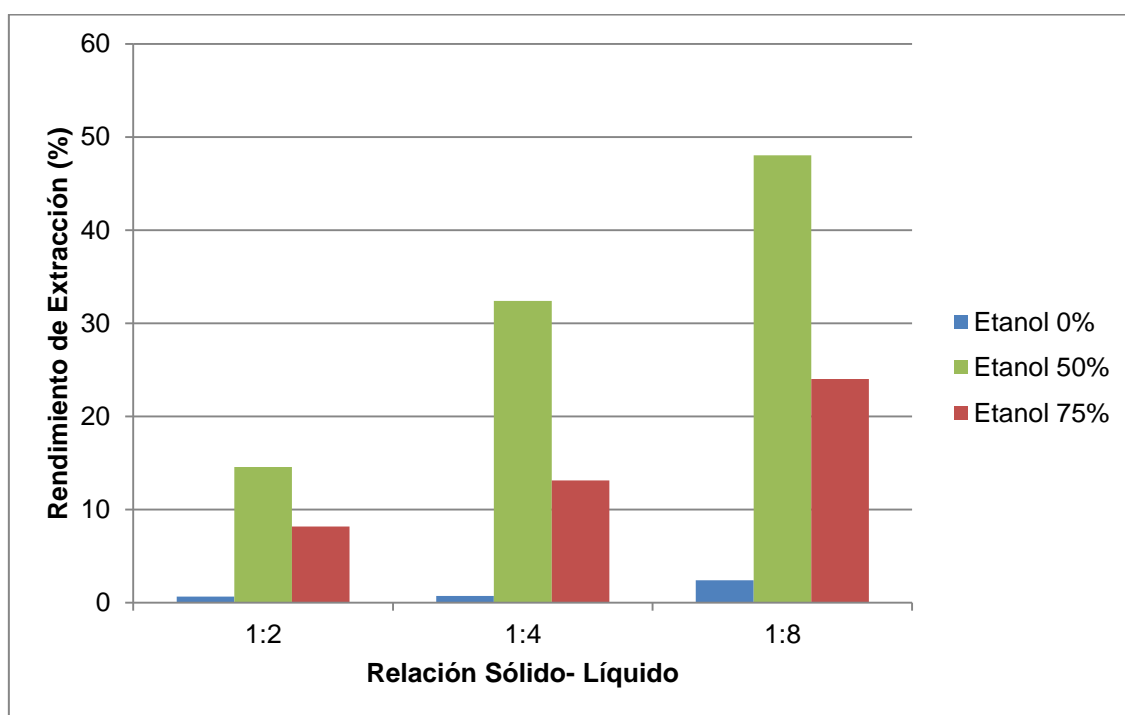


Figura 3.5 Porcentaje de rendimiento de extracción de las muestras preparadas según el diseño experimental, en relaciones sólido- líquido de 1:2, 1:4, y 1:8, con solventes acuosos etanol 0 %, etanol 50 % y etanol 75 %

Como resultado se encontró que, se logró un mayor porcentaje de rendimiento de extracción en muestras de placenta de cacao, es cuando la relación sólido- líquido fue alta.

De la sección 3.2.2.1 y 3.2.2.2, se determinó que la concentración de solvente con el que se obtuvo mayor concentración de polifenoles fue el etanol al 50 % y la relación sólido- líquido 1:2. No obstante, se descartó la relación 1:2 por entregar el menor rendimiento de extracción, a pesar de conseguir la mayor concentración de polifenoles.

Se evaluaron, entonces, los tratamientos con relación 1:4 y 1:8, ya que permitieron obtener una concentración fenólica y rendimiento de extracción considerables. Las concentraciones promedio de polifenoles de estos extractos fueron 15,36 y 7,03 mg EAG/L, respectivamente.

Con estos valores, se evaluó la posibilidad de inhibición del pardeamiento enzimático, donde se pudo apreciar la relación entre la relación sólido- líquido, la concentración de polifenoles y la capacidad de inhibición, como se indica en la siguiente sección.

3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL EXTRACTO FENÓLICO DE PLACENTA DE CACAO EN EL EXTRACTO ENZIMÁTICO DE POLIFENOLOXIDASA

Se evaluaron los dos extractos fenólicos que presentaron los mejores resultados de concentración de polifenoles y rendimiento de extracción. Estos extractos fueron: con etanol al 50 % y relación sólido- líquido 1:4, y el extracto con etanol al 50 % y relación 1:8, que tuvieron una cantidad de polifenoles de 15,36 mg EAG/L y 7,03 mg EAG/L, respectivamente.

En la Figura 3.5, se muestra la actividad enzimática de la polifenol oxidasa en el extracto enzimático de manzana respecto a la actividad de este extracto añadidos los extractos fenólicos de concentraciones 15,36 mg EAG/L y 7,03 mg EAG/L.

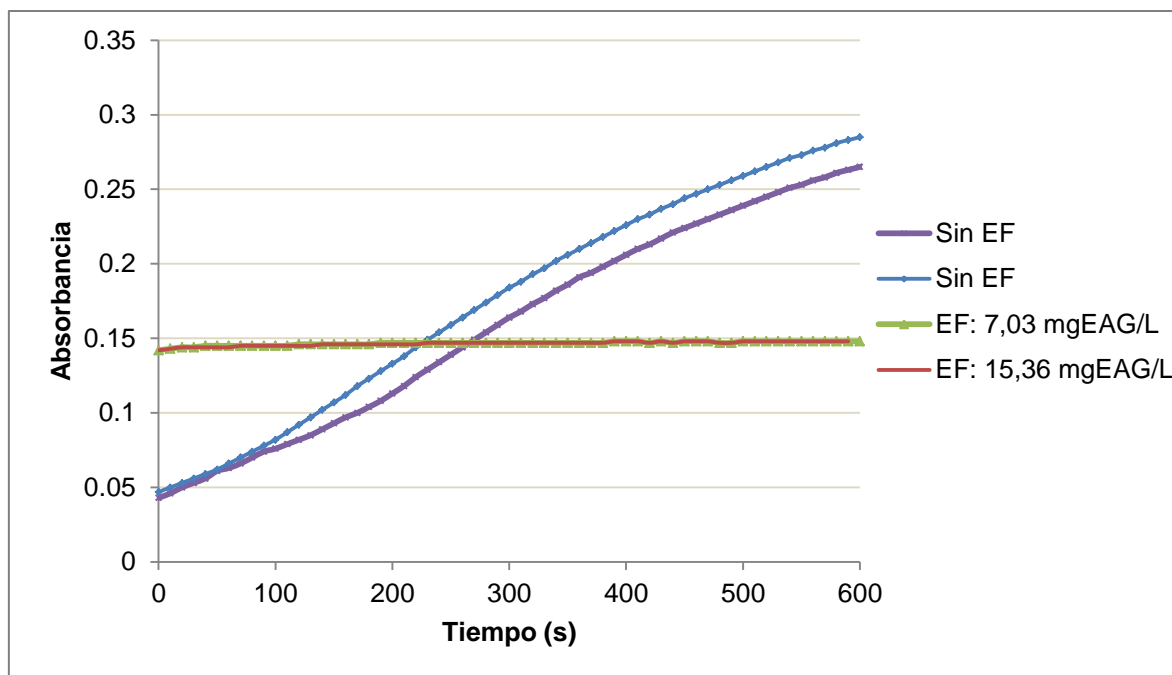


Figura 3.6 Cinética de reacción de los extractos enzimáticos de manzana (Sin EF) frente a la cinética de reacción de este extracto añadido el extracto fenólico (EF) de concentraciones 7,03 mg EAG/L y 15,36 mg EAG/L

En la Figura 3.6, se observan las curvas Sin EF (azul y violeta) que corresponden a la cinética de reacción del extracto enzimático de manzana. Las curvas EF (rojo y verde) corresponden a la cinética de reacción del extracto enzimático de manzana cuando se le ha colocado el extracto fenólico de placenta de cacao de concentración 7,03 mg EAG/L y 15,36 mg EAG/L.

La pendiente representa la velocidad de reacción. La pendiente de las gráficas EF (rojo y verde) señalan que fue afectada la velocidad de reacción, lo que implica que ocurrió una inhibición de la enzima polifenol oxidasa. Sin embargo, en comparación con la gráfica EF correspondiente a la concentración 15,36 mg EAG/L (rojo), donde la pendiente permaneció por más tiempo constante, la gráfica EF de la concentración 7,03 mg EAG/L (verde) tiende a aumentar el valor de su pendiente en el transcurso del tiempo. Esto indicaría una menor inhibición de la enzima.

Entre las gráficas Sin EF, se nota que la actividad de la enzima inicia en un mismo valor de absorbancia; sin embargo, estas curvas se alejan entre sí a pesar de tener una tendencia similar. Esto pudo deberse a varios errores de repetibilidad en el desarrollo del análisis experimental, como el manejo de condiciones de temperatura para la lectura del extracto enzimático.

Se calcularon las pendientes de las curvas Sin EF y EF, para cada concentración de extracto evaluado como se muestra a continuación:

- Extracto fenólico de concentración 7,03 mg EAG/L:

Sin EF:

$$y = 0,000349x + 0,0508 \quad [3.1]$$

EF:

$$y = 5,91E - 6x + 0,145 \quad [3.2]$$

- Extracto fenólico de concentración 15,36 mg EAG/L:

Sin EF:

$$y = 0,000367x + 0,0608 \quad [3.3]$$

EF:

$$y = 7,58E - 6x + 0,144 \quad [3.4]$$

Se calculó el porcentaje de inhibición con la ecuación 2.4 de la sección 2, tomando en cuenta el valor de las pendientes de las líneas de tendencia de las gráficas Sin EF, 3.1 y 3.3, con el valor de las pendientes de las líneas de tendencia de EF, 3.2 y 3.4. Un ejemplo de cálculo de este parámetro se presenta más adelante en el Anexo III.

Los porcentajes de inhibición de la polifenol oxidasa de los extractos fenólicos en el extracto enzimático de manzana evaluados fueron: 97,93 % y 83,08 %. El mayor valor de porcentaje de inhibición, se pudo deber al valor de concentración de compuestos fenólicos del extracto fenólico, 15,36 mg EAG/L, analizado. Este valor resulta cercano para inhibidores naturales como el ácido cítrico, uno de los ácidos de origen orgánico que presenta un porcentaje de inhibición de la polifenol oxidasa del 98,9 % en un extracto enzimático de manzana (Muñoz et al., 2007, p. 163).

Adicionalmente, como señala la Figura 3.6, el efecto de inhibición de la actividad perdura en el tiempo de ensayo. Este factor es tan importante como el porcentaje de inhibición de la enzima, pues esto quiere decir que, a más de inhibir en gran proporción la actividad de la enzima, este extracto fenólico resistió todo el tiempo de ensayo, que fue de 10 minutos.

Las gráficas de la Figura 3.6, además, señalan una relación entre sus pendientes y la cantidad de enzima que se mantuvo activa en el extracto, o las unidades de actividad de la enzima. Se analizó el número de unidades de actividad de polifenol oxidasa, tomando en cuenta las consideraciones especificadas en la sección 2.3. Estos valores se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 3.9 Unidades de actividad (UA) de la polifenol oxidasa de los extractos evaluados

Extracto	Actividad Enzimática (UA/min)
Sin extracto fenólico (Sin EF)	22,02
Extracto fenólico 7,03 mg EAG/L	0,354
Extracto fenólico 15,36 mg EAG/L	0,455

Con el extracto de concentración 15,36 mg EAG/L, el número de unidades varía de 22,02 por minuto a 0,455 unidades de actividad por minuto, cuando se le colocó el extracto. Esto se puede observar en el cambio de la pendiente de la curva cuando está sin el extracto fenólico (azul) frente al colocar el extracto (rojo), como se muestra

en la Figura 3.6. Por otro lado, con el extracto de concentración 7,03 mg EAG/L, el número de unidades de actividad de la enzima varía de 22,02 a 0,354 por minuto con el extracto fenólico.

Al calcular la diferencia entre las unidades de actividad de polifenol oxidasa sin y con extracto fenólico, y al dividir este resultado para el número de unidades de actividad de la enzima con extracto fenólico, se obtiene un valor igual al porcentaje de inhibición expresado anteriormente.

Como se señaló en la sección 3.2, el análisis de las mejores condiciones del proceso de obtención del extracto entregó, como resultado, dos extractos fenólicos que se evaluaron. Sin embargo, la aplicación del extracto de 7,03 mg EAG/L no sería posible.

El resultado de la evaluación de la actividad de la polifenol oxidasa en el extracto enzimático, cuando se colocan cada uno de los dos extractos fenólicos evaluados, mostró distintos valores de porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasas, 97,93 % para una concentración de extracto igual a 15,36 mg EAG/L, y 83,08 % para el extracto de concentración 7,03 mg EAG/L.

El primer extracto, con aproximadamente la mitad de la concentración de polifenoles del segundo extracto, logró un buen porcentaje de inhibición. Esto supone que, al evaluar el doble de concentración fenólica, se esperaba obtener la totalidad de la inhibición. El extracto de 15,36 mg EAG/L, con corta diferencia, logró el 97,93 % de la inhibición de la enzima, valor cercano al 100 %, lo que confirmó la estimación propuesta.

El extracto fenólico tiene como objetivo la inhibición de la actividad de la polifenoloxidasas. Tomando como premisa este objetivo, las condiciones más adecuadas del proceso para la obtención de un extracto fenólico de la placenta del cacao se establecieron con el extracto de concentración fenólica: 15,36 mg EAG/L,

es decir, con etanol 50 % y relación sólido- líquido 1:4, ya que entregaron un porcentaje de inhibición de la polifenoloxidasas más alto.

Un valor aproximado de la cantidad de extracto que se necesitaría para inhibir el pardeamiento de un kilogramo de manzana, se calcula a continuación, a partir del número de unidades de actividad de la polifenol oxidasa sin influencia del extracto fenólico (22,02 UA/min), para la cantidad de manzana utilizada en el ensayo (20 g de manzana) y, las unidades de actividad de la polifenol oxidasa del extracto fenólico de mayor concentración (0,455 UA/min) y el volumen de extracto fenólico colocado en el ensayo de actividad de la enzima (480 µL).

$$\frac{\text{Número de UA sin EF}}{m_{\text{manzana}}} \times \frac{\text{Volumen etanol del EF aplicado al ensayo de inhibición}}{\text{Número de UA con EF}} \quad [3.5]$$

$$22,02 \frac{\text{UA}}{\text{min}} \times \frac{\text{min}}{20 \text{ g manzana}} \times \frac{\text{min}}{0,455 \text{ UA}} \times 480 \mu\text{L EF} \times \frac{1 \text{ L}}{1 \text{ E}6 \mu\text{L}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} = 1,16 \frac{\text{L EF}}{\text{kg manzana}}$$

Esto quiere decir, por cada kilogramo de manzana, se necesitarían 1,16 L de extracto fenólico de concentración 15,36 mg EAG/L, para inhibir el pardeamiento enzimático. Sin embargo, sería recomendable evaluar la posibilidad de inhibición cuando se ha colocado en la solución muestra, menor cantidad de extracto fenólico, por ejemplo, 48 µL, diez veces menos que lo colocado en este ensayo.

3.4 DISEÑO DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LA PLACENTA DE CACAO A PARTIR DE DESECHOS DE PROCESAMIENTO

El diseño del procesamiento de la placenta de cacao para la extracción de compuestos fenólicos se realizó con referencia al porcentaje de desechos de la producción de cacao de la parroquia El Progreso. Este valor fue 160 qq (quintales)

de placenta de cacao al año, que equivale al 4 % del total del procesamiento de 4 000 qq de mazorcas de cacao al año, la producción total de cacao de la parroquia el progreso (Macas, 2008, p. 1).

Con base en los resultados experimentales para el establecimiento de las condiciones óptimas en la obtención del extracto fenólico y la evaluación de la inhibición de la actividad de la polifenoloxidasas, se logró realizar balances de masa y energía, y construir diagramas de bloques y de proceso. Estos gráficos indicaron la secuencia de operaciones unitarias que se establecieron para el proceso de obtención de extracto fenólico.

Las condiciones óptimas evaluadas en la sección 3.2 indican que el solvente adecuado, de los evaluados, es etanol al 50 %, y la relación sólido- líquido más conveniente es 1:4. Estos factores influyeron en la selección de los equipos necesarios en el proceso y su respectivo dimensionamiento. Entre los equipos optados se tiene: molino de cuchillas, tamiz, tanque agitado para maceración, tanque de baño ultrasónico, centrífuga, filtro a vacío.

El diseño del proceso se realizó con la finalidad de operar 8 horas por día durante 20 días al mes, lo que implica 240 días al año. El flujo de placenta de cacao a procesar es 66,67 kg de placenta de cacao al día.

3.4.1 DIAGRAMA DE BLOQUES (BFD)

En esta sección se muestra el esquema de la totalidad del proceso de obtención del extracto fenólico de placenta de cacao. En la Figura 3.7, se presenta el diagrama de bloques (BFD) para el proceso de obtención del extracto fenólico de placenta de cacao.

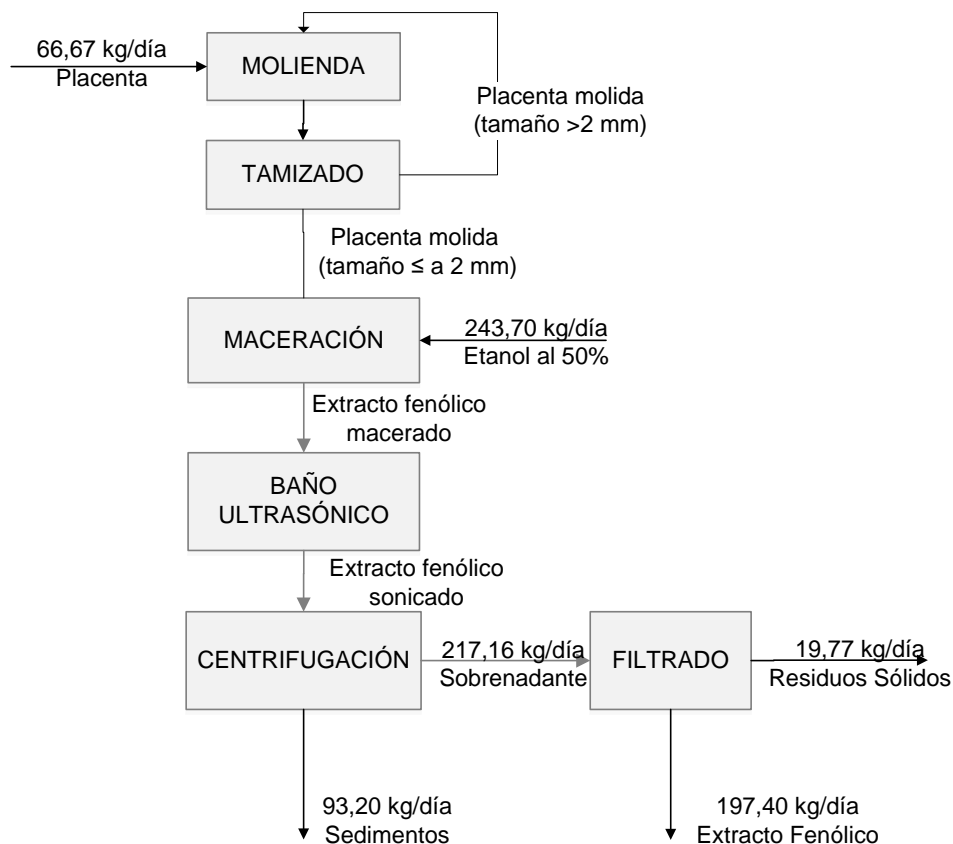


Figura 3.7 Diagrama BFD correspondiente al proceso para obtener extracto fenólico a partir de placenta de cacao

Se muestra, en la figura anterior, la secuencia de operaciones unitarias que se lleva a cabo con 66,67 kg de placenta de cacao al día para obtener extracto fenólico. El proceso inicia con la unidad de molienda hasta alcanzar un tamaño de partícula de la placenta menor o igual que 2 mm. Esta medida se verifica en el proceso de tamizado, previo a la maceración.

La placenta molida y tamizada, se macera con etanol al 50 % en un tanque agitado para maceración, por 24 h, que opera en modo batch. El extracto fenólico macerado se lleva a un tanque para baño ultrasónico que mejora la extracción de compuestos fenólicos en el solvente, por 20 min. Luego, se somete a centrifugación al finalizar el tiempo de sonicación, por 10 min. Finalmente, el sobrenadante del centrifugado se filtra para eliminar restos de placenta de cacao.

Es importante mencionar que en la centrifugación no se logró separar el precipitado del sobrenadante en su totalidad. Dentro de los tubos de centrifuga, al vaciar el sobrenadante, se logró observar un material gelatinoso que impidió la medida acertada del volumen de precipitado y sobrenadante. Por esta razón, se estimó una relación entre los volúmenes, tomando en cuenta el volumen de extracto obtenido en condiciones de etanol 50 % y relación 1:4, 35 ml, y el volumen total ocupado en el tubo de centrifuga, 50 mL. Esta relación resultó en 2,33. Ejemplos de cálculo de cada corriente, se muestran en el Anexo IV.

3.4.2 DIAGRAMA DE FLUJO DEL PROCESO (PFD)

A continuación, se expone el diagrama PFD del proceso de obtención de extracto fenólico. El diagrama de flujo entrega mayor detalle del proceso, pues se visualizan los equipos principales del sistema y las conexiones entre estos. Además, se conoce datos de temperatura y presión de cada operación unitaria.

En la Figura 3.8, se muestra el diagrama de flujo del proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao. En la Tabla 3.10, se visualiza una lista de los equipos principales del proceso expuesto en el diagrama PFD, con sus respectivos códigos de identificación. Mientras, en la Tabla 3.11, se muestra la identificación de cada corriente descrita en la Figura 3.8.

Tabla 3.10 Lista de los equipos del diagrama PFD del proceso

Equipo	Código de Identificación
Molino de cuchillas	M- 101
Tamiz	T- 102
Tanque de maceración	TM- 103
Baño ultrasónico	TK- 104
Centrífuga	C- 105
Filtro	F- 106

3.4.3 DIMENSIONAMIENTO Y SELECCIÓN DE EQUIPOS

3.4.3.1 Molino de cuchillas

La selección del molino de cuchillas se realizó con base en el tamaño de partícula a obtener y la cantidad de placenta de cacao a tratar. El molino (M-101) corresponde a una trituradora para alimentos fibrosos, capaz de manejar un flujo de procesamiento hasta de 85 kg/h. El tamaño de partícula a obtener con este equipo está entre 1 a 10 mm. Además, está adaptado un tamiz de 2 mm de abertura, una tolva para el ingreso de la placenta de cacao a procesar y un recipiente para la recolección del material triturado y tamizado. En el Anexo V, Tabla AV.1 se encuentra la hoja de especificaciones técnicas para este equipo.

3.4.3.2 Tanque de maceración

El dimensionamiento del tanque de maceración (TM-103) se hizo de acuerdo con los resultados obtenidos experimentalmente en la sección 3.2. Se coloca como solvente para la maceración etanol al 50 % en proporción 1:4. Es decir, en el procesamiento de 66,67 kg al día de placenta de cacao se necesitan 243,703 kg al día de etanol al 50 %.

El tanque de maceración requiere agitación durante 24 h para conseguir la extracción mayor cantidad de polifenoles de la placenta del cacao, por lo que se ha considerado la adaptación de un agitador. Además, la maceración ocurre a temperatura ambiente, lo que no hace necesario un sistema de calentamiento o enfriamiento.

El volumen del tanque se obtuvo a partir de los datos de volumen de solvente y placenta, que se calculan con la densidad de ambos factores. La densidad de la placenta de cacao se obtuvo del documento escrito por Quimbita (2008), 1 048 kg/m³, valor de densidad del jugo de la placenta con exudado de cacao. Se

calcula el volumen con la ecuación 3.6, que proviene de la expresión de la densidad.

$$V = \frac{m}{\delta} \quad [3.6]$$

Donde:

V: Volumen de etanol al 50 %/placenta de cacao

m: Masa de etanol al 50 %/placenta de cacao

δ : Densidad de etanol al 50 %/placenta de cacao

- Etanol 50 %:

$$243,70 \text{ kg etanol } 50 \% \times \frac{1 \text{ m}^3}{913,84 \text{ kg etanol } 50 \%} = 0,27 \text{ m}^3 \text{ etanol } 50 \%$$

- Placenta de cacao:

$$66,67 \text{ kg placenta de cacao} \times \frac{1 \text{ m}^3}{1\,048 \text{ kg placenta de cacao}} = 0,064 \text{ m}^3 \text{ placenta de cacao}$$

A partir de estos valores, el tanque para el proceso de maceración debe ser de $0,33 \text{ m}^3$. El cálculo de las dimensiones del tanque se realizó con la premisa que la altura correspondería al doble del diámetro. Las características completas de este tanque se encuentran en la hoja de especificaciones técnicas, en el Anexo V, Tabla AV.2.

$$V = \pi \times H \times \frac{D^2}{4} = 0,33 \quad [3.7]$$

$$0,33 = \pi \times 2D \times \frac{D^2}{4}$$

$$D = 0,596 \text{ m}; H = 1,19 \text{ m}$$

3.4.3.3 Baño ultrasónico

La operación del baño ultrasónico (TK- 104) es por 20 minutos a una frecuencia de 40 Hz. El baño de ultrasonido seleccionado tiene capacidad de 130 L, lo que obliga a trabajar por lotes para completar la carga saliente del tanque de maceración. La hoja de especificaciones correspondiente a este equipo se encuentra en el Anexo V, Tabla AV.3.

3.4.3.4 Centrífuga

La selección de la centrífuga (C-105) para este proceso, se ejecutó a partir de los factores de velocidad requerida, 3 000 rpm, y la temperatura de centrifugación utilizada en la experimentación, 4 °C. Se requiere, además, una capacidad de 450 a 500 L. En el Anexo V, Tabla AV.4 se muestra la hoja de especificaciones de este equipo.

3.4.3.5 Filtro

La etapa de filtración durante los ensayos experimentales se llevó a cabo a través del uso de papel filtro Whatman No. 40, y se aceleró el proceso mediante una bomba de vacío. El filtro seleccionado (F-106) tiene características similares, como el tamaño de poro es 15 µm. La hoja de especificaciones del filtro de vacío a utilizar, se encuentra en el Anexo V, Tabla AV.5.

3.5 EVALUACIÓN DE LOS COSTOS DIRECTOS DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE PLACENTA DE CACAO

En esta sección, se analizarán los costos directos del proceso de extracción con la finalidad de hallar una estimación del costo de producir un kilogramo de extracto fenólico. Este valor se obtiene al calcular los costos directos y al dividir este valor para la producción anual de extracto de polifenoles.

La evaluación de los costos directos del proceso de extracción de compuestos fenólicos de la placenta de cacao consideró los factores que se mencionan a continuación, como se han señalado en Peters et al. (2003, p. 234).

- Costo de equipos
- Costo de instalación
- Costo de la materia prima
- Costo de servicios industriales (Peters *et al.*, 2003, p. 234).

Se tomó en cuenta que la materia prima no tiene costo, por tratarse de desechos recuperados; sin embargo, se estableció el costo del transporte de la placenta de cacao desde la plantación del sector hasta el centro de acopio en El Progreso, como costo de materia prima.

En la Tabla 3.12 se toma en cuenta el valor del flete por kilómetro, cuando la distancia es menor a 400 kilómetros, es 0,68 dólares según publicación de la CNTT (Consejo Nacional de Tránsito y Transporte Terrestre, 2003). La distancia estimada es 100 kilómetros, es decir 6,80 dólares por viaje, y se toma 2 viajes por día. El valor del etanol 99 % se tomó de Cox, Astudillo y Tobalina (2007), que señala un costo aproximado de \$0,55 de los ingenios azucareros del Ecuador. El costo de agua y electricidad se determinó a partir del valor estipulado para el sector industrial (p. 7; p. 4).

Tabla 3.12 Costos de producción por compra de materia prima y servicios industriales

Materia prima/ Servicio	Costo Unitario	Cantidad por año	Costo por año (USD/año)
Placenta de cacao (costo del flete)	13,60 USD*	240 días	3 264
Etanol 99 %	0,55 USD/L	32 324,8 L	17 778,6
Agua	0,55 USD/1000 L	240 000 L	132
Electricidad	0,091 USD/kW	26 880 kW	2 446,08
TOTAL			23 620,68

*Calculado a partir del costo del flete por día \$6,80 y aproximación de 100 km entre sitios

El costo del etanol 99 % es el de mayor influencia dentro de los costos de producción de la Tabla 3.12. Esto se debe a varias razones. Una de ellos es el costo de producción de etanol que influye en el costo de venta en el país. Otro elemento es la materia prima que tiene un costo de cero, pero se reemplaza con el costo de transporte. Además, el costo de los servicios industriales es menor frente al del etanol, pues estos servicios son subsidiados por el gobierno ecuatoriano. A continuación, en la Tabla 3.13, se tienen las estimaciones sobre los valores en el costo de compra de los equipos principales del proceso de obtención de extracto fenólico.

Tabla 3.13 Costo aproximado de equipos principales para el proceso

Equipo	Costo Unitario	Cantidad requerida	Costo (USD)
Molino de cuchillas	2 000	1	2 000
Tanque de maceración	4 000	1	4 000
Baño ultrasónico	6 000	1	6 000
Centrífuga	10 000	1	10 000
Filtro de vacío	2 000	1	2 000
TOTAL			24 000

La estimación de la Tabla 3.12, se realizó a partir de gráficas del texto de Peters *et al.*, (2003) que se muestran en el Anexo VI, que corresponden al costo de los tanques, sistema de centrifugación y filtro y molino.

En la Tabla 3.13, se observa que el equipo de mayor costo es la centrífuga. Esto se debe a la gran capacidad de operación que tiene el equipo seleccionado, asimismo, este tipo de sistemas de separación tienen alta eficiencia para este tipo de condiciones de operación. El costo de los demás equipos resulta razonable respecto a las características que posee cada uno de los equipos seleccionados; sin embargo, es posible abaratar estos valores si se utilizan equipos de segunda mano, o reacondicionados. El porcentaje de ahorro puede alcanzar el 80 % del valor de un equipo nuevo. Además, se podría reemplazar el filtro de vacío por un filtro de presión, cuyo costo fluctúa entre \$ 1 000 – \$ 2 000, para igual capacidad de procesamiento (Peters *et al.*, 2003, p. 864).

El costo de instalación se determinó a partir de lo mencionado por Peters *et al.*, (2003), 20 % del precio de compra de sistemas de centrifugación, 65 %, para un filtro, y el 30 %, para tanques y molinos. Además, se tienen fracciones sobre el precio de compra de cada equipo que ayudan a estimar un valor de la implementación del sistema eléctrico y de tuberías. Estas fracciones son 0,10 para la implementación del sistema eléctrico, y 0,31 para la implementación del sistema de tuberías, de una planta procesadora sólido- fluido. Por ejemplo, el costo total de la instalación de los equipos principales se calculó como sigue, tomando en cuenta los porcentajes señalados (p. 245).

$$\text{Costo de instalación} = 0,3 * \sum \text{Costo tanques y molinos} + 0,20 * \text{Costo centrífuga} + 0,65 * \text{Costo filtro}$$

$$\text{Costo de instalación} = 0,3 * (2\ 000 + 4\ 000 + 6\ 000) + 0,2 * 10\ 000 + 0,65 * 2\ 000$$

$$\text{Costo de instalación} = 8\ 900$$

Tabla 3.14 Costo aproximado de implementación de equipos, sistema eléctrico y de tuberías

Implementación	Costo (USD)
Instalación de equipos	8 900
Implementación sistema eléctrico	2 400
Implementación sistema de tuberías	7 440
TOTAL	18 740

La suma de los valores totales obtenidos en la Tabla 3.12, 3.13 y 3.14 da como resultado el valor total de producción anual de extracto fenólico, tal como se observa a continuación.

$$\$ 24\,000 + \$ 18\,740 + \$ 23\,620,68 = 66\,360,68$$

El precio por kilogramo de extracto fenólico obtenido se calcula al dividir el valor total de producción anual para la producción anual de extracto fenólico, como se muestra en la siguiente expresión.

Valor producción anual:

$$197,40 \frac{\text{kg EF}}{\text{día}} \times \frac{240 \text{ días}}{\text{año}} = 47\,376 \frac{\text{kg EF}}{\text{año}}$$

Por lo tanto, el precio del kilogramo de extracto fenólico es:

$$\frac{\$66\,360,68}{47\,376 \text{ kg}} = 1,40 \frac{\text{USD}}{\text{kg}}$$

El precio de una pulpa de frutas se encuentra en 2 USD por 500 gramos de fruta, aproximadamente. En un kilogramo, significarían 4 USD. El valor del extracto fenólico es 35 % menos que el costo de una pulpa de fruta.

Se toma en consideración estos valores y, conjuntamente, la cantidad de extracto fenólico que se necesitaría para inhibir 1 kilogramo de manzana. Se estima la

densidad del extracto fenólico como la densidad del solvente etanol 50 % para el análisis.

$$1,16 \frac{\text{L EF}}{\text{kg manzana}} \times \frac{1\text{m}^3}{1000\text{L}} \times \frac{913,84 \text{ kg}}{\text{m}^3} = 1,06 \frac{\text{kg EF}}{\text{kg manzana}}$$

Es decir, para inhibir 1 kilogramo de manzana, se necesita 1,06 kilogramo de extracto fenólico.

$$1,06 \frac{\text{kg EF}}{\text{kg manzana}} \times \frac{1,40 \text{ USD}}{\text{kg EF}} = 1,48 \frac{\text{USD}}{\text{kg manzana}}$$

Este valor calculado implica que, por cada kilogramo de manzana donde se aplicaría el extracto fenólico, el costo es 1,48 USD. Por lo tanto, en una pulpa de manzana, de un kilogramo que cuesta 4 USD, el valor del inhibidor del pardeamiento equivale al 37 % de su costo. Esto asegura que el extracto resulta muy costoso frente al valor que se paga por la pulpa y no es rentable frente al costo de un antioxidante sintético. Sin embargo, es recomendable un análisis de la capacidad de inhibición del extracto si se coloca menos cantidad de extracto fenólico por kilogramo de manzana. Esto podría señalar una posibilidad de disminución de costos en caso de presentar igual porcentaje de inhibición de la polifenol oxidasa.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. A partir de la caracterización realizada, la placenta de cacao tuvo un pH de 3,54, °Brix 13,83, acidez titulable del 0,86 %, un porcentaje de humedad del 69,09 %, y una concentración de polifenoles igual a 61,069 mg EAG/g placenta.
2. La polaridad del solvente tuvo influencia sobre la concentración de los polifenoles extraídos. Al variar el porcentaje del etanol en el solvente acuoso de extracción, se observó la formación de una curva que denotaba un óptimo de concentración con una solución al 50 % de etanol; sin embargo, es necesario evaluar la extracción para soluciones acuosas entre 0 % y 50 %.
3. Se concluyó que la concentración de solvente y relación sólido- líquido evaluados influyen significativamente sobre la concentración de polifenoles de los extractos obtenidos.
4. La mayor concentración de polifenoles conseguida fue de 35,15 mg EAG por litro de extracto, cuando las condiciones del proceso fueron: etanol 50 % y relación 1:2.
5. Al aumentar la proporción de solvente utilizado en la extracción, se obtiene un mayor volumen del extracto y la cantidad de polifenoles extraídos aumenta; sin embargo, su concentración disminuye debido a la dilución por la mayor cantidad de solvente.
6. Los extractos fenólicos presentaron un porcentaje de inhibición de la polifenol oxidasa de 83,08 % y 97,93 %, al trabajar con concentraciones 7,03 mg EAG por litro y 15,36 mg EAG por litro, respectivamente.

7. Se determinó que, para inhibir el pardeamiento enzimático en 1 kilogramo de manzana, se necesitan 1,06 kilogramos de extracto fenólico. Este resultado señala que se necesita igual o mayor cantidad de extracto por kilogramo de fruta, por lo que es necesario concentrar el extracto fenólico previo a su aplicación.
8. Al diseñar un proceso para tratar 66,67 kg de placenta de cacao al día, se obtiene 197,40 kg de extracto fenólico al día, y el costo de producción de un kilogramo de extracto fenólico sería 1,40 USD.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Probar otros tratamientos de extracción de compuestos fenólicos y comparar resultados de concentración, tiempo de extracción, y rendimiento de extracción
2. Es conveniente evaluar el mejoramiento del proceso al realizar un pre tratamiento a la materia prima a utilizar. Esto podría resultar en una mayor cantidad de polifenoles recuperados.
3. Realizar la identificación del tipo de polifenoles presentes en la placenta de cacao con el propósito de ampliar el campo de aplicación de este residuo de la mazorca de cacao.
4. Se recomienda analizar en otras frutas la probabilidad de que el extracto fenólico presente distintos porcentajes de inhibición de la polifenol oxidasa.
5. Comparar la capacidad de inhibición de la polifenol oxidasa en otros extractos de concentraciones diferentes a las usadas en este trabajo.

6. Se sugiere comparar el número de unidades de actividad de la enzima después de haberse sometido a un proceso de inhibición físico o químico, con el número UA de polifenol oxidasa obtenido en este estudio.

7. Comparar el costo del extracto con el costo que conlleva un procedimiento de inhibición del pardeamiento enzimático, como el escaldado, con el objetivo de verificar, a través de más factores, la factibilidad de aplicación a nivel industrial del extracto fenólico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Álvarez, N. y Bagué, A. (2012). *Tecnología Farmacéutica*. San Vicente. España: Editorial Club Universitario.
2. Banco Central del Ecuador. (2012) Exportaciones por grupos de productos en dólares FOB, *Boletín Anuario 2012, Comercio exterior*, p.1. Recuperado de <http://www.bce.fin.ec/index.php/component/k2/item/327-ver-bolet%C3%ADn-anuario-por-a%C3%B1os> (Diciembre, 2015).
3. Baraona, M. y Sancho, E. (1991). *Fruticultura Especial: Piña y Papaya*. (1ra. ed.). San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED).
4. Blainski, A. Lopes, G. C., y De Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from limonium brasiliense L. *Molecules*, 18(6), 6852–6865. doi:10.3390/molecules18066852
5. Bolaños, N. Lutz, G. y Herrera, C. (2003). *Química de Alimentos: Manual de Laboratorio*. (1ra. ed.). San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
6. Bravo, K. Muñoz D, K. Calderón G, J. y Osorio D, E. J. (2011). Desarrollo de un método para la extracción de polifenol oxidasa de uchuva (*Physalis peruviana* L.) y aislamiento por sistemas bifásicos acuosos. *Vitae*, 18(2), 124–132. Recuperado de [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext &pid=S0121-40042011000200003](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042011000200003) (Enero, 2015)

7. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56(11), 317–333. doi:10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x
8. Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M. y Velić, D. (2007). Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236–242. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027
9. Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Jokić, S., Mujiã, I., Bilic, M., y Velid, D. (2011). Effect of Extraction Conditions on the Extractability of Phenolic Compounds from Lyophilised Fig Fruits (*Ficus Carica* L). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 195–199. doi:10.2478/v10222-011-0021-9
10. Chávez, F., Aranda, M., García, A., y Pastene, E. (2011). Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 10(3), 265–280. Recuperado de <http://www.revistaidea.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/viewFile/261/257> (Diciembre, 2015)
11. Claramunt, R., Cornago, P., Esteban, S., Farrán, A., Pérez, M., y Sanz, D. (2015). *Principales Compuestos Químicos*. (7ma. ed.). Madrid, España: UNED.
12. Consejo Nacional de Tránsito y Transporte Terrestre (CNTT o ANT), 2003, Ley Orgánica de Transporte Terrestre, Tránsito y Seguridad Vial, *Registro Oficial* 398, 1-13. Recuperado de: <http://www.obraspublicas.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/03/LEY-1-LEY-ORGANICA-DE-TRANSPORTE-TERRESTRE -Y-SEGURIDAD-VIAL.pdf> (Diciembre, 2015)

13. Cox, G., Astudillo, J. y Tobalina, C., 2007, Proyecto de implementación de una planta productora de etanol en base a la caña de azúcar, en la Península de Santa Elena, provincia del Guayas, ESPOL, p. 1-8. Recuperado de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/1463/1/2937.pdf> (Diciembre, 2015)
14. Da Silva, R., Darmon, N., Fernandez, Y. y Mitjavila, S., 1991, Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of procyanidins from grape seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 9, p. 1549-1552. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Jorge_RicardodaSilva/publication/231543590_Oxygen_free_radical_scavenger_capacity_in_aqueous_models_of_different_procyanidins_from_grape_seeds/links/0046352934ec09450d000000.pdf (Diciembre, 2015)
15. Delhom, M. (1985). La Calidad de Manzanas y Peras. *Hojas Divulgadoras, Publicaciones Agrarias*, 85(6), 1-20. Recuperado de http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1985_06.pdf (Diciembre, 2015)
16. Denoya, G. I., Ardanaz, M., Sancho, A. M., Benítez, C. E., González, C. y Guidi, S. (2012). Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas. *Revista de Investigación Agropecuaria*, 134, 3-7. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1669-23142012000300010&script=sci_arttext&tlng=pt (Diciembre, 2015)
17. Doğan, S. Turan, P. Doğan, M. Arslan, O. y Alkan, M. (2005). Purification and characterization of *Ocimum basilicum* L. polyphenol oxidase. *Journal*

of Agricultural and Food Chemistry, 53(26), 10224–10230.
doi:10.1021/jf051646j

18. Domínguez, H. (2013). *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Filadelfia, Estados Unidos: Woodhead Publishing Series.
19. Georgé, S. Brat, P. Alter, P. y Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1370–1373.
doi:10.1021/jf048396b
20. Gil, A., y Serra, L. (2010). *Libro Blanco del Pan*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
21. Granatum, P. (Ed.) (2011). Punicalagina Antioxidante del Zumo de Granada y el Extracto de Granada, en la Alimentación Funcional del Futuro: Granada Mollar Elche. *La Fruta Granada Cultivada en España*. (Vol. 1) (pp.1-76). Murcia, España.
22. Graziani, L., Ortiz, L. y Parra, P., 2003, Características químicas de la semilla de diferentes tipos de cacao de la localidad de Cumboto, Aragua, *Agronomía Tropical*, 53, 2, p.133-144. Recuperado de http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/Agronomia%20Tropical/at5302/arti/farinas_l.htm (Diciembre, 2015)
23. Hardenburg, R., Watada, A., y Wang, C. (1988). *Almacenamiento Comercial de Frutas, Legumbres y Existencias de Floristerías y Viveros*. (1ra. ed.). San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).

24. Hii, C. L. Law, C. L. Cloke, M. y Suzannah, S. (2009). Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems Engineering*, 102(2), 153–161. doi:10.1016/j.biosystemseng.2008.10.007
25. Jalal, M. y Collin, H. (1977). Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *Theobroma cacao*. *Phytochemistry*, 1977(16), 1377-1380. doi: 10.1016/S0031-9422(00)88786-5
26. Jalil, A. M. M. e Ismail, A. (2008). Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules*, 13(9), 2190–2219. doi:10.3390/molecules13092190
27. Jayaprakasha, G. K. Selvi, T. y Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International*, 36(2), 117–122. doi:10.1016/S0963-9969(02)00116-3
28. Keen, C. L., Holt, R. R., Oteiza, P. I., Fraga, C. G., y Schmitz, H. H. (2005). Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1 Suppl), 298–303. doi:10.1016/j.amjcard.2008.02.012
29. Kim, H., y Keeney, P. (1984). Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3693-3701. doi: 10.1111/j.1365-2621.1984.tb10400.x
30. Liu, D., y Liptak, B. (1999). *Environmental Engineers' Handbook*. Estados Unidos: Chapman y Hall, CRC Press LLC.
31. Llivipuma Arias, M. (2013). *Identificación y caracterización de oportunidades de negocios para jóvenes del área rural vinculados a la cadena productiva del cacao en el cantón Pasaje de la provincia de El Oro*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de ingeniera

comercial mención en administración de empresas). Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador

32. Macas, F. (2008). El Progreso produce cacao de primera para exportación. *El Universo*, 1. Recuperado de www.eluniverso.com/2008/08/22/0001/12/00134ADEEBFB4AD188392E4C867B59C8.html (Enero, 2015)
33. Mier, H., y Cáez, G. (2011). Contenido de polifenoles, carotenos y capacidad antioxidante en frutos de uchuva (*Physalis Peruviana*) en relación a su estado de maduración. En Revista ReCiTeIA (Ed.). *Composición de Uchuva en relación a su maduración*. (pp. 102-115). Bogotá, Colombia: ReCiTeIA.
34. Mirzapour, M., Hamedi, M., Rahimipannah, M., y Shockpour, N. (2012). Walnut leaves-influence of different extraction methods on the total phenol and flavonoid contents. *AgroFOOD industry Hi Tech*, 23(3), 27-30. Recuperado de teknoscienze.com (Diciembre, 2015)
35. Muñoz, K., Bravo, K., Zapata Ocampo, P., y Londoño, J. (2007). Caracterización preliminar del enzima polifenol oxidasa en frutas tropicales: Implicaciones en su proceso de industrialización. *Scientia et Technica*, 13(33), 161–164. Recuperado de: revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6097 (Enero, 2015)
36. Naczk, M., y Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 95–111. doi:10.1016/j.chroma.2004.08.059
37. Navarre, C. (2010). *L'oenologie*. (7ma. ed.). París, Francia: Ed. Lavoisier.

38. Ohene, E. (2014). *Cocoa Production and Processing Technology*. Boca Raton, Estados Unidos: CRC Press, Taylor y Francis Group.
39. Othman, A., Ismail, A., Abdul Ghani, N., y Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.12.021
40. Ortiz, L., Camacho, G. y Graziani, L., 2004, Efecto sobre la calidad del grano fermentado de cacao, *Agronomía Tropical*, v.54, n.1, Maracay, 1. Recuperado de: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002-192X2004000100003&sCript=sci_arttext (Noviembre, 2015)
41. Packer, L., y Cadenas, E. (2001). *Handbook of Antioxidants*. (2da. ed.). Nueva York, Estados Unidos: Marcel Dekker.
42. Padilla, F., Rincón, A., y Bou-Rached, L. (2008). Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(3), 303-308. Recuperado de: <http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v58n3/art14.pdf> (Mayo, 2015)
43. Perry, R., y Green, D. (2001). *Manual del Ingeniero Químico*. (7ma. ed.). Madrid, España: Mc Graw-Hill.
44. Peters, M., Timmerhaus, K., y West, R. (2003). *Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. (5ta. ed.). Nueva York, Estados Unidos: Mc Graw-Hill.
45. Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., y Núñez, M. J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111–2117. doi:10.1021/jf0488110

46. Porter, L. L. (2006). Benefits of Cocoa Polyphenols. *Manufacturing Confectioner*, 86(6), 49–53. Recuperado de: <http://www.gomc.com/firstpage/200606049.pdf> (Noviembre, 2015)
47. Quimbita, F., y Rodríguez, P. (2008). *Aprovechamiento del exudado y la placenta del cacao (Theobroma cacao) para la producción de una bebida alcohólica de baja concentración y elaboración de néctar*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de ingenieros agroindustriales no publicado). Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador.
48. Quimbita, F., Rodríguez, P., y Vera, E. (2013). Uso del exudado y placenta del cacao para la obtención de subproductos. *Revista Tecnológica ESPOL*, 26(1), 8-15. Recuperado de: <http://learningobjects2006.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/viewFile/272/193> (Mayo, 2015)
49. Rein, D., Paglieroni, T. G., Pearson, D. A, Wun, T., Schmitz, H. H., Gosselin, R., y Keen, C. L. (2000). Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *The Journal of Nutrition*, 130, 2120S–6S. Recuperado de: jn.nutrition.org (Diciembre, 2015)
50. Romero, M. (2004). *Plantas Aromáticas: Tratado de Aromaterapia Científica*. (1ra. ed.). Buenos Aires: Editorial Kier.
51. Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. (1ra. ed.). Santafé de Bogotá, Colombia: Quebecor-Impreandes.
52. Siedentopp, U. (2009). El cacao, planta medicinal y de deleite. *Revista Internacional de Acupuntura*, 3, 197-200. doi: 10.1016/j.dza.2009.07.007

53. Theppakorn, T., y Ploysri, K. (2014). Development of a visual test kit for estimation of total polyphenols in tea. *International Food Research Journal*, 21(2), 501–506. Recuperado de: [http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20\(02\)%202014/10%20IFRJ%2021%20\(02\)%202014%20Theppakorn%20265.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/21%20(02)%202014/10%20IFRJ%2021%20(02)%202014%20Theppakorn%20265.pdf) (Diciembre, 2015)
54. Tsao, R., y Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 812(1-2 SPEC. ISS.), 85–99. doi:10.1016/j.jchromb.2004.09.028
55. Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., y Oomah, B. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113-4117. doi: 10.1021/jf9801973
56. Villavicencio, A. (2001). *Caracterización Química del Nivel de Fermentación y Estudio de los Parámetros de Calidad del Cacao Producido en el Ecuador*. (Proyecto de titulación previo a la obtención del título de licenciada en química especialización química analítica no publicado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
57. Villegas, W., Acereto, P., y Vargas, M. (2006). *Análisis Ultravioleta- Visible: La teoría y la práctica en el ejercicio profesional*. Mérida, México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY).
58. Vinson, J. A. Proch, J. y Zubik, L. (1999). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(12), 4821–4824. doi:10.1021/jf990312p

59. Viñas, M., Usall, J., Echeverría, G., Graell, J., Lara, I., y Recasens, D. (2013). *Poscosecha de pera, manzana y melocotón*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
60. Wollgast, J., y 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
61. Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. (Volumen 1). (3ra. ed.). Sunderland, Estados Unidos: Sinauer Associates

ANEXOS

ANEXO I

PROCESO DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO RICO EN POLIFENOLES A PARTIR DE PLACENTA EXTRAÍDA DE LA MAZORCA DEL CACAO



Figura A1.1 Proceso de obtención del extracto fenólico a escala laboratorio

ANEXO II

EJEMPLO DE CÁLCULO DE CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES EN EL EXTRACTO DE PLACENTA DE CACAO

En la Figura 3.1, de la sección 3, se muestra la curva de calibración construida con estándares de ácido gálico a partir de una solución madre de ácido gálico de concentración 500 ppm. Se obtiene la ecuación que relaciona la absorbancia de las muestras y la concentración, y se determina la concentración de compuestos fenólicos totales en el extracto de placenta de cacao.

De la regresión lineal:

$$y = mx + b \quad [\text{Al.1}]$$

Donde:

y = absorbancia de la muestra

x = concentración (mg/L de ácido gálico)

b = intercepto en el eje Y

Se tomó como ejemplo el cálculo de la concentración de polifenoles totales en el ensayo de extracción con agua a una relación sólido- líquido de 1:2. Con la regresión lineal de la curva de calibración de la Figura Al.1 se tiene la siguiente ecuación:

$$y = 0,0099x + 0,0273 \quad [\text{Al.2}]$$

La absorbancia de esta muestra es:

$$y = 0,055$$

$$x = \frac{y - 0,0273}{0,0099} = \frac{0,055 - 0,0273}{0,0099} = 2,7979 \text{ mg ácido gálico/ L solución}$$

ANEXO III

EJEMPLO DE CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA POLIFENOL OXIDASA CON EL EXTRACTO FENÓLICO DE PLACENTA DE CACAO

A partir de la gráfica de actividad de la polifenol oxidasa, se pueden obtener dos ecuaciones de rectas de la regresión lineal: la primera, cuando el extracto enzimático de manzana no posee el extracto fenólico (Sin EF), y la segunda, cuando sí contiene el extracto fenólico (EF).

A continuación, se utilizan las ecuaciones del ensayo de inhibición con el extracto fenólico a condiciones de solvente: etanol 50%, y relación sólido- líquido 1:4.

Sin EF:

$$y = 0,000367x + 0,0608 \quad \text{[AII.1]}$$

EF:

$$y = 7,58E - 6x + 0,144 \quad \text{[AII.2]}$$

Se emplea la ecuación 2.4, señalada en la sección 2.3, para el cálculo.

$$\% \text{Inhibición} = \left(1 - \frac{m_x}{m_b}\right) \times 100$$

Donde:

m_x : Valor de la pendiente de la recta trazada para cada extracto enzimático de manzana a evaluar

m_b : Valor de la pendiente de la recta trazada para cada extracto fenólico de placenta de cacao a evaluar

$$\% \text{ Inhibición} = \left(1 - \frac{7,58\text{E} - 6}{0,000367}\right) \times 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = 97,93$$

ANEXO IV

EJEMPLO DE CÁLCULO DE LAS CORRIENTES DEL DIAGRAMA PFD PLANTEADO PARA EL PROCESO

Balance de Masa

En la evaluación del proceso de extracción, para una capacidad de procesamiento de 66,67 kg de placenta de cacao al día, se realizó un balance de masa con la finalidad de obtener datos sobre las corrientes dentro del proceso y el flujo de extracto fenólico. Para el desarrollo del cálculo, se estimó una operación de 240 días al año.

La cantidad de placenta a procesar está dada por el 4 % de la cantidad de mazorcas procesadas en El Progreso

$$160 \frac{\text{qq}}{\text{año}} \times \frac{100 \text{ kg}}{1 \text{ qq}} \times \frac{\text{año}}{240 \text{ días}} = 66,67 \frac{\text{kg}}{\text{día}}$$

El rendimiento del extracto, calculado en la sección 3.2, para las condiciones óptimas del proceso, es 32,4 mL extracto fenólico/10 g placenta.

$$66,67 \frac{\text{kg placenta}}{\text{día}} \times \frac{1000 \text{ g}}{1 \text{ kg}} \times \frac{32,4 \text{ mL Extracto Fenólico}}{10 \text{ g placenta}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ L}} \\ \times \frac{913,84 \text{ kg}}{\text{m}^3} = 197,4 \frac{\text{kg Extracto Fenólico}}{\text{día}}$$

La cantidad de etanol 50 % que se requiere para la etapa de maceración es calculada a partir de la relación sólido- líquido 1:4, que resultó la óptima para este proceso.

$$66,67 \frac{\text{kg placenta}}{\text{día}} \times \frac{1000\text{g}}{1 \text{ kg}} \times \frac{40 \text{ mL Etanol } 50 \%}{10 \text{ g placenta}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ m}^3}{1000\text{L}} \\ \times \frac{913,84 \text{ kg Etanol } 50 \%}{\text{m}^3} = 243,70 \frac{\text{kg Etanol } 50 \%}{\text{día}}$$

Las corrientes de entrada en el proceso corresponden a la placenta de cacao fresca y el etanol 50 %.

$$66,67 \text{ kg placenta} + 243,70 \text{ kg Etanol } 50 \% = 310,37 \text{ kg}$$

En la etapa del baño ultrasónico, no existe ingreso de otro material, por lo que la corriente de salida de esta operación unitaria es 310,37 kg.

En la centrifugación, la relación entre el sobrenadante y el precipitado supuesta durante el ensayo fue aproximadamente 2,33 (35/15, el volumen total en el tubo de centrífuga fue 50 mL, donde 35 mL correspondieron al sobrenadante y 15 mL a placenta).

$$\text{Sobrenadante} + \text{Precipitado} = 310,37$$

$$2,33\text{Precipitado} + \text{Precipitado} = 310,37$$

$$\text{Precipitado} = 93,20 \text{ kg}$$

$$\text{Sobrenadante} = 217,16 \text{ kg}$$

Para conocer el valor de la corriente de residuos sólidos de la etapa de filtrado, se toma en cuenta que, a esta operación unitaria ingresan 217,16 kg de la etapa de centrifugación.

$$\text{Residuos sólidos} + \text{Extracto Fenólico} = \text{Sobrenadante}$$

$$\text{Residuos sólidos} + 197,40 = 217,16$$

Residuos sólidos = 19,77 kg placenta

La cantidad de etanol 99 % a utilizar se calcula a continuación.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$99 \% \times V_1 = 50 \% \times 266,68 \text{ L}$$

$$V_1 = 134,68 \text{ L etanol } 99 \%$$

ANEXO V

HOJAS DE ESPECIFICACIÓN DE LOS EQUIPOS PRINCIPALES SELECCIONADOS

Tabla AV.1 Hoja de especificación del molino para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao

Nombre del equipo: Molino de cuchillas	
Código de Identificación: M-102	Tipo de operación: Continuo/Batch
Especificaciones de Catálogo	
Capacidad máxima: 85 kg/h	Modelo: PULVERISETTE 25
Tamaño partícula alimentación: 120×85 mm	Marca: Fritsch
Dimensiones: 45×65×63 cm	Tamiz: 2 mm en el fondo
Material de construcción: acero inoxidable	Potencia: 2.2 kW
Peso del equipo: 75 kg	Velocidad del rotor: 300- 360 rpm
Esquema del Equipo	
<p>1 Tolva</p> <p>2 Pinza de Enganche</p> <p>3 Tapa de cierre</p> <p>4 Recipiente colector</p> <p>5 Panel de control</p> <p>6 Filtro de aire</p> <p>7 Cuchillo fijo #3</p> <p>8 Interruptor de seguridad</p> <p>9 Tamiz</p> <p>10 Rotor</p> <p>11 Cuchillo fijo #1</p> <p>12</p>	

Tabla AV.2 Hoja de especificación del tanque para maceración para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao

Nombre del equipo: Tanque agitado	
Código de Identificación:	Tipo de operación:
Especificaciones de Catálogo	
Capacidad máxima: 500 L/300 kg Diámetro: 75 cm Altura: 115 cm Material de construcción: acero inoxidable Diámetro del espesor: 25 cm Potencia del motor: 1.5- 3 hp	Modelo: DV 10 Marca: VEYCO Tipo: Tanque con agitador y dispersor Agitador: variación de velocidad mediante inversor de frecuencia controlado por PLC Capacidad agitador: 0,5- 50 hp
Esquema del Equipo	
<p>A 75 cm B 115 cm C 45 cm D 20 cm E 100 cm F 300 cm</p>	

Tabla AV.3 Hoja de especificación del baño ultrasónico para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao

Nombre del equipo: Baño ultrasónico	
Código de Identificación: TK-10	Tipo de operación: Batch
Especificaciones de Catálogo	
Capacidad máxima: 130 L Dimensiones de la cuba: 650×360×550 mm Dimensiones externas: 860×560×850 mm Frecuencia: 40 kHz Material de construcción: acero inoxidable	Modelo: SONICA® 130L EP Marca: SOLTEC® Potencia: 2400 W Tiempo de operación: 0 a 99 min
Esquema del Equipo	
<p>850 mm</p> <p>860 mm</p> <p>650 mm</p> <p>19,05 mm</p>	

Tabla AV.4 Hoja de especificación de la centrífuga para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao

Nombre del equipo: Centrífuga refrigerada	
Código de Identificación: C-105	Tipo de operación: Batch
Especificaciones de Catálogo	
Capacidad máxima: 100- 1200 L/h	Modelo: Z 800 K HA
Energía total instalada: 5 kW	Marca: RÖSLER
Tanque colector: 340 L	Tipo: Semi automática
Material de construcción: Polietileno	Velocidad rotacional: 3160 rpm
Esquema del Equipo	
	

Tabla AV.5 Hoja de especificación del filtro para el proceso de obtención de extracto fenólico a partir de placenta de cacao

Nombre del equipo: Filtro de vacío	
Código de Identificación: F-106	Tipo de operación: Semi continuo
Especificaciones de Catálogo	
Capacidad máxima: 6 m ³ /h Finura del filtro: 15 µm Peso: 0,13 kg Vacío máximo: -950 mbar	Modelo: VF- 6 G¼- 1G15 Marca: SCHMALZ Tipo: generador de vacío Carcasa de aluminio, tapa enroscada
Esquema del Equipo	
	
<p>D 48 cm L 41 cm H 54 cm L1 108 cm H2 30 cm L2 42 cm G1 G¼"-HE</p>	
	

ANEXO VI

GRÁFICAS DEL CRITERIO DE ESTIMACIÓN DE COSTOS DE COMPRA DE LOS EQUIPOS PRINCIPALES DEL PROCESO

A continuación, se exponen las gráficas tomadas de referencias bibliográficas que ayudaron en la estimación de los costos de compra de los principales equipos del proceso de obtención de extracto fenólico. La Figura AV.1, muestra la curva de estimación del costo del molino.

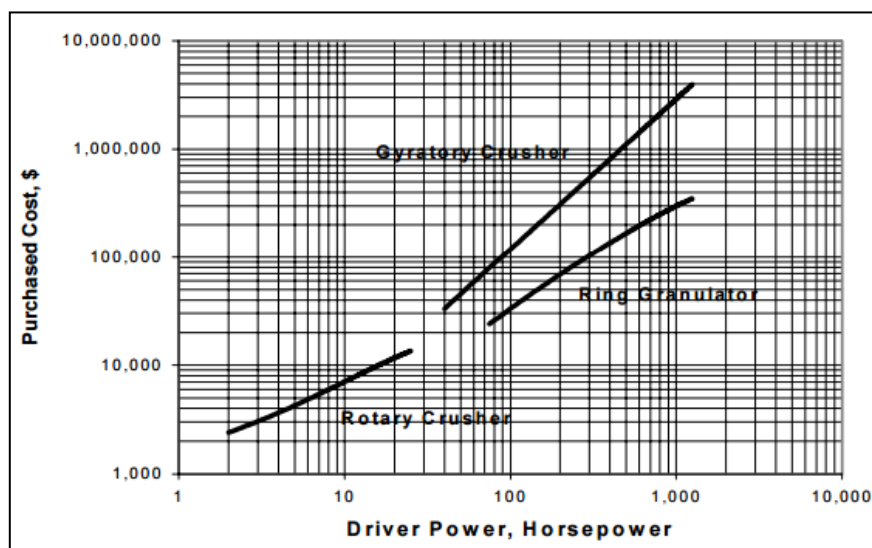


Figura AV.1 Costo de compra del molino de cuchillas
(Peters *et al.*, 2003, p. 586)

En la Figura AV.2, Figura AV.3 y Figura AV.4, se muestran las curvas de estimación del costo de compra de los tanques, centrífuga y filtro, respectivamente, a partir de las especificaciones técnicas de cada uno.

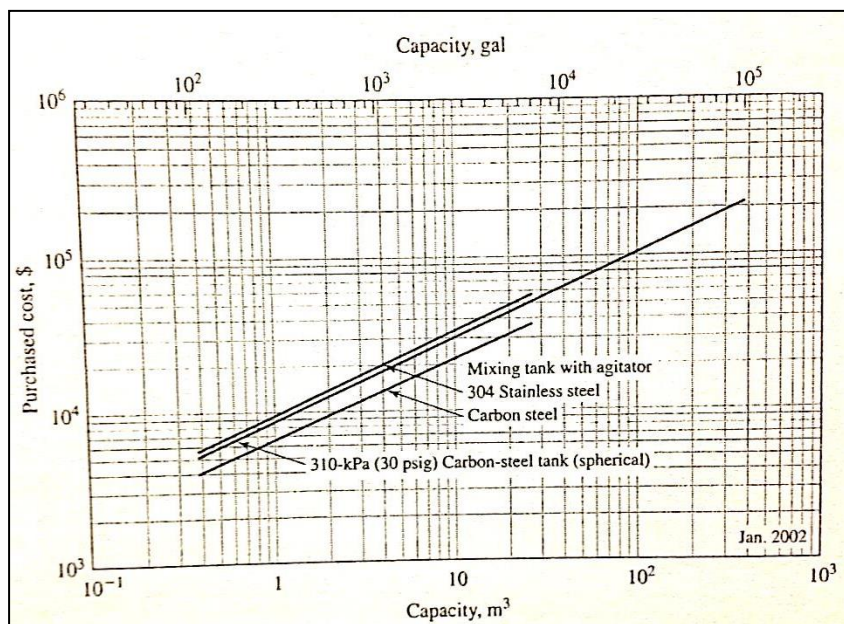


Figura AV.2 Costo de compra del tanque de maceración y baño ultrasónico (Peters *et al.*, 2003, p.557)

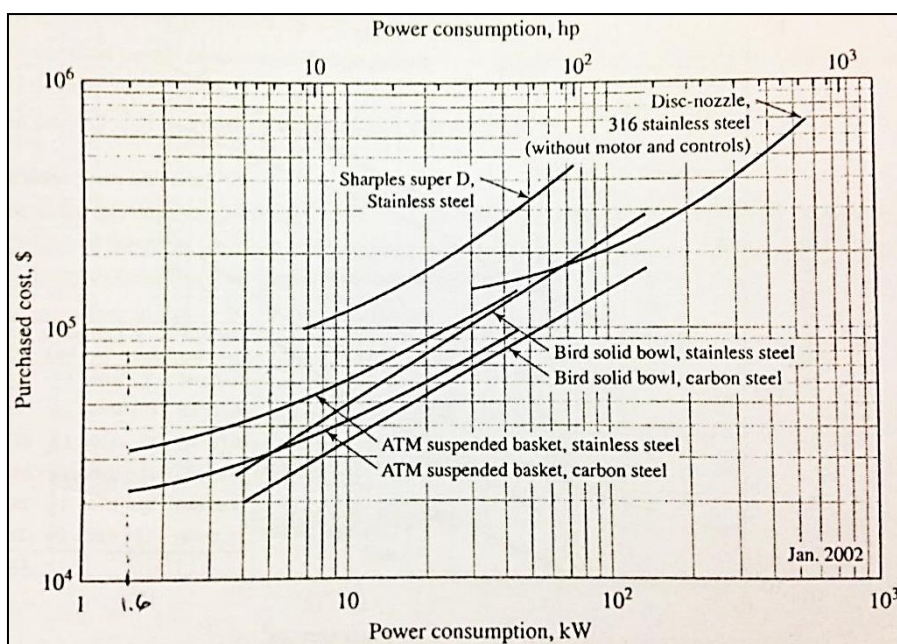


Figura AV.3 Costo de compra de la centrífuga (Peters *et al.*, 2003, p.867)

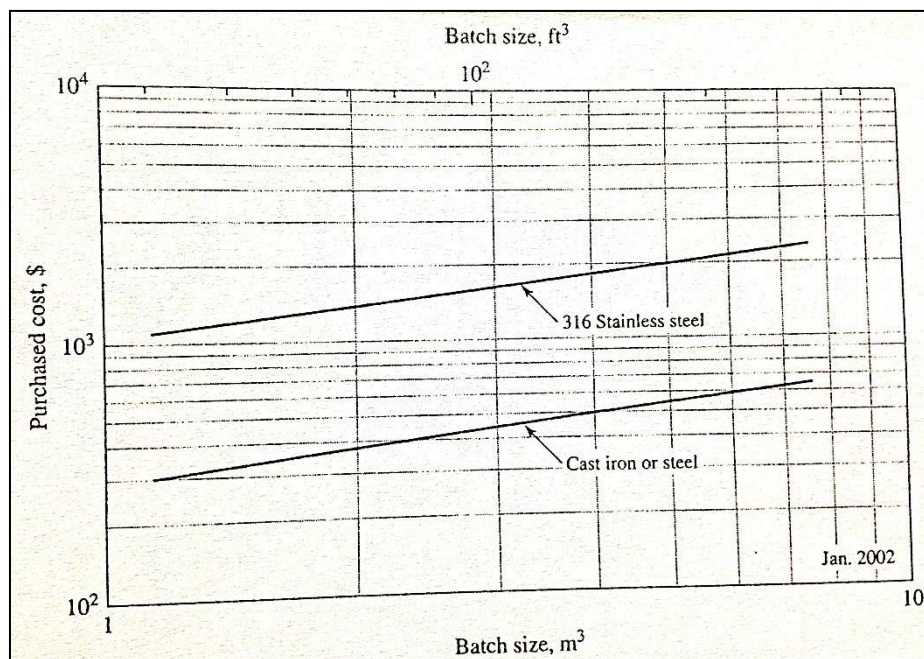


Figura AV.4 Costo de compra del filtro
(Peters *et al.*, 2003, p.865)