

# Extracción de polifenoles totales asistida por enzimas, a partir de residuos de la industria del cacao

## Extraction of total polyphenols assisted by enzymes from cocoa industrial wastes

Nataly Botero R.<sup>1</sup>, Laura V. Londoño<sup>1</sup> y Luisa F. Rojas<sup>1</sup>

### RESUMEN

La explotación comercial del cacao, genera un volumen de residuos que puede utilizarse para la obtención de compuestos antioxidantes, entre otros usos. La cascarilla de cacao (tegumento), contiene un  $23,3 \pm 0,4$  mg GAE  $g^{-1}$ , bajo la metodología estándar de extracción de polifenoles totales. Éste residuo fue seleccionado para desarrollar un protocolo de extracción asistido por enzimas, donde se evaluó celulasa, pectinasa y una mezcla de ambas enzimas en diferentes concentraciones ( $25-75$  U  $mL^{-1}$ ). Otras variables como concentración de sustrato, pH y tiempo de reacción fueron evaluadas, mediante un diseño central compuesto. La celulasa en una concentración de  $75$  U  $mL^{-1}$ , un pH de  $6,6$ ; una concentración de cascarilla de  $185$  g  $L^{-1}$  y un tiempo de reacción de  $100$  min, fueron las condiciones óptimas para obtener un extracto rico en polifenoles totales de  $1,88$  mg GAE  $mL^{-1}$ , el cual fue validado posteriormente, obteniéndose una concentración de  $1,527 \pm 0,013$  mg GAE  $mL^{-1}$ .

**Palabras clave:** antioxidantes, celulasa, pectinasa, cascarilla de cacao.

### ABSTRACT

Commercial exploitation of cocoa generates a volume of waste material that can be used to obtain antioxidant compounds, among others; Cocoa husk (tegument) contains  $23.3 \pm 0.4$  mg GAE  $g^{-1}$  under the standard methodology of total polyphenol extraction. This residue was selected to develop an extraction protocol assisted by enzymes, where cellulase, pectinase, and a mixture of both enzymes at different concentrations ( $25-75$  U  $mL^{-1}$ ) were evaluated. Other variables such as substrate concentration, pH and reaction time were assessed by using a central composite design. The cellulase in a concentration of  $75$  U  $mL^{-1}$ , pH  $6.6$ , a husk concentration of  $185$  g  $L^{-1}$  and a reaction time of  $100$  min, were the optimal conditions to obtain an extract rich in polyphenols of  $1.88$  mg GAE  $mL^{-1}$ , which was subsequently validated giving a concentration of  $1.527 \pm 0.013$  mg GAE  $mL^{-1}$ .

**Key words:** antioxidants, cellulase, pectinase, cocoa husk.

## Introducción

Los polifenoles son compuestos antioxidantes con beneficios para la salud, ya que inhiben o disminuyen la aparición de las reacciones de cadena oxidativa, generalmente producidas por los radicales libres (Ackar *et al.*, 2013).

La extracción de bioactivos es realizada principalmente con solventes químicos. Sin embargo, estos procesos han mostrado dificultades y baja eficiencia (Ovando y Waliszewsk, 2005). Por esta razón se han venido implementando, métodos asistidos por agentes físicos, químicos o enzimáticos que permiten liberar con mayor facilidad los compuestos bioactivos a partir de diferentes matrices vegetales. El proceso de extracción asistido por enzimas hidrolíticas, permite las paredes celulares vegetales, las cuales se componen de polímeros como celulosa, hemicelulosa y pectina, por lo cual se convierten en un método

interesante para la obtención de compuestos activos para la industria de alimentos (Boulila *et al.*, 2015).

El uso de residuos agroindustriales, se constituyen en una alternativa promisoría para la extracción de polifenoles. Del fruto del cacao, se aprovechan sólo las semillas que equivalen al 30% del fruto, el cual es procesado para la elaboración de diferentes productos. El contenido de polifenoles totales en cacao puede oscilar entre  $75,5$  y  $43,5$  mg GAE  $g^{-1}$  (Wollgast y Anklam, 2000; Othman *et al.*, 2007; Gil, 2012). El presente trabajo presenta un protocolo de extracción eficiente y económico de polifenoles asistido por enzimas, a partir de residuos del cacao.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Para el desarrollo de este trabajo se empleó tegumento cacao (*cocoa bean shells*), suministrado por la Compañía

Nacional de Chocolates, proveniente de la planta de procesamiento de Rionegro, Antioquia.

### Cuantificación del contenido de polifenoles totales (CPT)

Para la determinación de CPT, se realizó una extracción de 2,0 g secos y molidos con 30 mL de solvente isopropanol-agua, 60:40 asistido por ultrasonido, según Gil (2012). La cuantificación fue realizada mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu. La cuantificación de CPT, empleado como estándar una curva de ácido gálico, expresado en mg equivalentes de ácido gálico (mg GAE) por gramo de muestra seca. Para el análisis de los extractos, los resultados fueron expresados en mg GAE mL<sup>-1</sup>.

### Efecto del tipo de enzima y su concentración

Se evaluó mediante un diseño factorial el efecto del tipo de enzima y su concentración, en tres niveles. Tipo de enzima: celulasa, pectinasa, Cel-Pec, concentración: 25, 50 y 75 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. La variable respuesta fue el contenido de polifenoles totales en mg GAE mL<sup>-1</sup>.

Para el desarrollo de los experimentos, se tomaron 133 g L<sup>-1</sup> (peso seco) de sustrato y se depositaron en matraces de 250 mL. El volumen total de reacción fue de 20 mL. Se aplicó el tratamiento enzimático indicado por el diseño y los frascos fueron incubados durante 60 min a 150 rpm y 40°C. Posteriormente, se cuantificó el contenido de CPT.

### Optimización del proceso enzimático.

El proceso de extracción se optimizó, evaluando pH, la C de sustrato y el t de reacción de acuerdo a los niveles establecidos: pH: 4-6, C sustrato (g L<sup>-1</sup>): 50-150, t (h): 0,5-1,5. Los experimentos fueron realizados en matraces de 250 mL. Se aplicó el tratamiento indicado por el diseño y los frascos fueron incubados a 150 rpm y 40°C. Para ajustar el pH, se empleó buffer fosfato 0,2 M.

### Análisis estadísticos

La desviación estándar y el análisis de varianza los experimentos, fue determinada con el paquete estadístico *GraphPad Prism 5.0*. Los datos generados por el diseño central compuesto fueron analizados con el paquete estadístico *StatGraphics Centurion XV.I*.

## Resultados y discusión

Tres lotes de cascarilla de cacao diferentes, fueron analizados con el fin de obtener el valor promedio de polifenoles totales para establecer el punto de partida. Los análisis basados en la metodología clásica de extracción mejorada por Gil (2012), mostró un valor promedio de 23,3±0,4 mg GAE

g<sup>-1</sup>, equivalente a un extracto de 0,932±0,017 mg GAE mL<sup>-1</sup>. El alto contenido de polifenoles encontrado en el tegumento de cacao, comparado con cáscaras de otros residuos como el café (15,020±0,183 mg GAE g<sup>-1</sup>, datos no publicados), es posible debido al alto contenido que presentan los granos de cacao cultivados en Colombia, los cuales oscilan entre 44,940±1,174 y 70,090±1,988 mg GAE g<sup>-1</sup>, dependiendo de la variedad (Carrillo *et al.*, 2014).

### Efecto del tipo de enzima y su concentración

Los factores estudiados tipo de enzima y concentración fueron estadísticamente significativos, con un nivel de 0,05 en la figura 1, se observa que mediante el tratamiento de los residuos de cacao con celulasa en una concentración de 75 U mL<sup>-1</sup>, es posible obtener un extracto rico en polifenoles de 1,337±1,171 mg GAE mL<sup>-1</sup>, mayor que el obtenido con el proceso de extracción convencional, 0,932±0,017 mg GAE mL<sup>-1</sup>, en el cual es empleado un solvente orgánico isopropanol-agua, en proporción 60:40 y asistido por ultrasonido (Gil, 2012). De igual manera, es alcanzado un mayor contenido de polifenoles (0,969±0,101 mg GAE mL<sup>-1</sup>), cuando se adiciona pectinasa, a la misma concentración.

El contenido de polifenoles totales alcanzado con la combinación celulasa-pectinasa en una concentración de 50 U mL<sup>-1</sup>, no presentó diferencias estadísticamente significativas, comparado con el obtenido para con celulasa en concentración de 75 U mL<sup>-1</sup>. No obstante, el uso de pectinasa, en las tres concentraciones evaluadas no mostró una mejora en el proceso de extracción. En este sentido, se observa que el uso de celulasa durante la extracción permite lograr una mayor ruptura de las paredes celulares del tegumento de cacao, mejorando así dicho proceso, dado que en la composición del tegumento de cacao predomina la celulosa sobre la composición de pectina, con porcentajes de 17,4 y 4,7%, respectivamente (Baena y García, 2012).

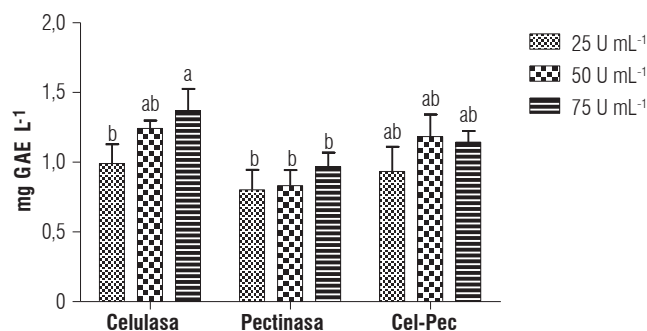


FIGURA 1. Efecto del tipo de enzima y concentración sobre CPT en extractos de cascarilla de cacao (n=3, ± desviación estándar). Promedios con letras distintas indican diferencia significativa (P≤0,05).

## Optimización del proceso de extracción mediado por enzimas

Las variables que mostraron un efecto significativo positivo sobre el proceso de extracción enzimática fueron el pH y la C de sustrato, presentando una mayor variación cuando los niveles evaluados pasan del nivel inferior al superior (de 50 a 150 g L<sup>-1</sup>, para el sustrato y de 4,0 a 6,0 para el pH). La variable tiempo no afectó significativamente el proceso de extracción, por lo que se decide fijarlo en un valor de 60 min para la elaboración del gráfico tridimensional (Fig. 2).

La celulasa comercial con la que se trabajó tiene un pH óptimo entre 6,0 y 7,0, confirmado con los resultados arrojados por el diseño. Por esta razón, es una variable que influye directamente sobre el proceso de extracción, así como la concentración de sustrato, ya que si el sistema se encuentra muy cargado de sustrato la enzima no actúa igual sobre el, y por el contrario si el sustrato está en muy bajas proporciones tampoco sería posible la extracción. Lo anterior se confirma con la Anova, donde se muestra que cuando la concentración de sustrato y el pH, actúan de forma independiente presentan un efecto significativo sobre la variable respuesta.

El proceso de optimización se basó en las predicciones arrojadas para obtener un mayor CPT, dando como valores: pH de 6,6, un tiempo de reacción de 99 min y una concentración de residuos de cacao de 184 g L<sup>-1</sup>, para obtener como variable respuesta 1,85 mg GAE mL<sup>-1</sup>. Estos resultados fueron validados con relación a las variables propuestas por el modelo, obteniéndose un valor de 1,527±0,013 mg GAE mL<sup>-1</sup>. Si se estima la concentración obtenida por gramo sería de 38,180 ±0,129 mg GAE g<sup>-1</sup>.

Si bien la concentración de polifenoles logró ser mejorada con la presencia de celulasa con relación al proceso de extracción mediado por solvente, la adición a la mezcla de

reacción de enzimas capaces de degradar lignina, podría incrementar comparativamente el contenido de polifenoles totales, en tanto que la lignina, un polímero que también forma parte del tegumento de las semillas y que está conformado por compuestos fenólicos que también pueden ser liberados de este tipo de tejido (Fortes, 2009).

Los resultados obtenidos con este procedimiento, son mayores a los reportados para extractos de polifenoles totales extraídos con celulasa y metanol en hojas de *Laurusnobilis L*, donde se obtuvieron valores de 7,12 ±0,64 mg GAE g<sup>-1</sup> de muestra seca (Boulila *et al.*, 2015). Se requiere a futuro identificar los polifenoles extraídos en los residuos de cacao, aunque es posible presumir que su composición debe ser similar a los extraídos directamente de la semilla, tales como catequina y epicatequina (Carrillo *et al.*, 2014).

## Conclusiones

Por medio de este trabajo, se optimizó y validó un método de extracción asistido por enzimas, con el cual se alcanzó un contenido de polifenoles totales de 1,527±0,013 mg GAE mL<sup>-1</sup>, mayor que el obtenido bajo un proceso de extracción con solvente orgánico y asistido por microondas, 0,932±0,017 mg GAE mL<sup>-1</sup>. En este sentido, se presenta un método eficiente, económico y con aplicación para la industria de alimentos, basado en criterios de sostenibilidad.

Los resultados alcanzados en esta investigación, son una evidencia del potencial beneficio para el sector agroindustrial, que presenta el uso de las enzimas en el manejo integral del cacao, identificado en nuestro país como producto agrícola promisorio de exportación.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a la UdeA, al Grupo de Biotransformación, por financiar y permitir el desarrollo de este

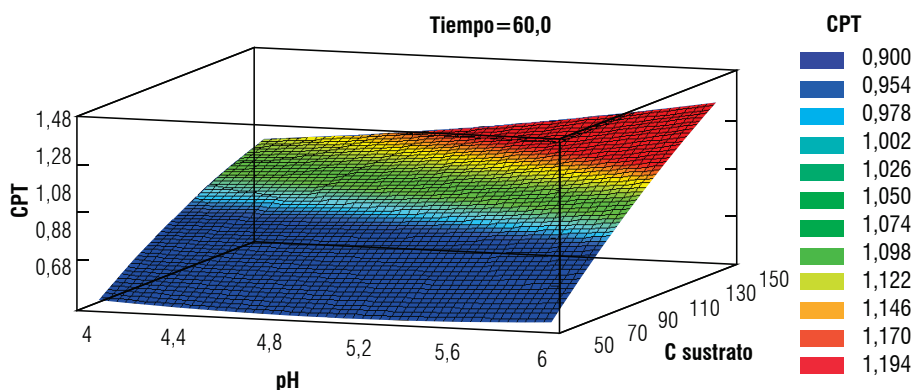


FIGURA 2. Superficie de respuesta.

trabajo. A la Empresa Sanadores Ambientales S.A.S por la financiación de este proyecto. A la CNCH, por el suministro de los residuos de cacao.

## Literatura citada

- Ackar, D., K. Valek, M. Valek, D. Šubarić, B. Miličević, J. Babić e I. Nedić. 2013. Cocoa polyphenols: Can we consider cocoa and chocolate as potential functional food? *J. Chem.* 2013, 1-7. Doi: 10.1155/2013/289392
- Baena, L. y N. García. 2012. Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarilla de las semillas tostadas de *Theobroma cacao* L. de una industria chocolatera colombiana. Trabajo de grado. Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.
- Boulila, A., I. Hassen, L. Haouari, F. Mejri, I. Amor, H. Casabianca y K. Hosni. 2015. Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Ind. Crops Prod.* 74, 485-493. Doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.050
- Carrillo, L., J. Londoño-Londoño y A. Gil. 2014. Comparison of polyphenol, methylxanthines and antioxidant activity in *Theobroma cacao* beans from different cocoa-growing areas in Colombia. *Food Res. Int.* 60, 273-280. Doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.019
- Gil, A. 2012. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Tesis de maestría. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
- Fortes, C. 2009. Qualidade fisiológica de sementes de soja convencional e RR associada ao conteúdo de lignina. Tesis de doctorado. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil.
- Othman, A., A. Ismail, N. Abdul y I. Adenan. 2007. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chem.* 100, 1523-1530. Doi: 10.1016/j.foodchem.2005.12.021
- Ovando, S. y K. Waliszewsk. 2005. Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia* 21(42), 111-120.
- Wollgast, J. y E. Anklam. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.* 33, 423-447. Doi: 10.1016/S0963-9969(00)00068-5