



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Extracción asistida por microondas de compuestos fenólicos de los subproductos del beneficio del cacao (*Theobroma cacao* L.)

Martha Cecilia Rincón Soledad

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2023

Extracción asistida por microondas de compuestos fenólicos de los subproductos del beneficio del cacao (*Theobroma cacao* L.)

Martha Cecilia Rincón Soledad

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director

Luis Felipe Gutiérrez Álvarez, Ph.D.

Codirector

Carlos Eduardo Narváez Cuenca, Ph.D.

Línea de Investigación:

Procesamiento de alimentos

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Biomoléculas Alimentarias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias

Bogotá, Colombia

2023

(Dedicatoria o lema)

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a que este trabajo se desarrollara, principalmente a mi hijo Miguel Ángel, mis padres y hermanos.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

Martha Cecilia Rincón

Fecha 10/05/2023

Resumen

La explotación cacaotera genera grandes cantidades de subproductos (principalmente la cacota (CPH) (86% del peso fresco) y la cascarilla (CBS) (12% del peso seco del grano)) pues sólo aprovecha económicamente los granos, que representa aproximadamente 10% de la masa del fruto fresco. A pesar del gran volumen de subproductos generados por el procesamiento del cacao y de su riqueza en compuestos de valor agregado, en la práctica común, éstos son usados como biofertilizante en las plantaciones de cacao, o simplemente desaprovechados. En este trabajo, se planteó la obtención de compuestos fenólicos y antioxidantes mediante extracción asistida por microondas (MAE) como alternativa de valorización de estos subproductos. Para cumplir este objetivo, se evaluó el efecto de la potencia (200, 300 y 400 W) y tiempo de extracción (120, 180 y 240 s), y de la relación de solvente/sólido (L/S) (30, 50 y 70 mL/g), en el contenido de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los extractos, empleando etanol al 63% como solvente, y siguiendo un diseño experimental de tipo Box-Behnken. La composición de los compuestos fenólicos para cascarilla fue determinada por UHPLC-DAD. A los extractos de CPH y CBS obtenidos en condiciones óptimas se les evaluó su actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales HT-29 (adenocarcinoma colorectal), A549 (adenocarcinoma de pulmón), CAL-27 (carcinoma escamo celular de lengua) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria). Los resultados mostraron que para la cacota, la potencia de extracción y la relación L/S fueron los factores más influyentes en las variables de respuesta, mientras que para la cascarilla fue más influyente el tiempo de extracción. El mayor rendimiento, contenido de fenoles y capacidad antioxidante (FRAP, DPPH) para la cacota en condiciones óptimas se obtiene a 397,52 W; 233,98 s y 69,99 mL/g. En la cascarilla las condiciones óptimas se obtienen a 399,88 W; 217,42 s y 69,71 mL/g, encontrando que este último subproducto principalmente está compuesto por teobromina y cafeína. En cuanto a la evaluación *in vitro* sobre las líneas celulares, los extractos de los subproductos del beneficio del cacao mostraron baja selectividad y actividad citotóxica.

Palabras clave: Valorización de subproductos; extracción asistida por microondas; compuestos antioxidantes; optimización; procesamiento del cacao.

Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from cocoa (*Theobroma cacao* L.) mill by-products

Abstract

Cocoa farming generates large quantities of by-products (mainly cocoa pod husk (CPH) (86% of the fresh weight) and cocoa bean shell (CBS) (12% of the dry weight of the bean)), since only the seed, which represents approximately 10% of the mass of the fresh fruit, is economically exploited. Despite the large volume of by-products generated by cocoa processing and their richness in value-added compounds, in common practice, these are used as biofertilizer in cocoa plantations, or simply wasted. In this work, the obtaining of phenolic compounds and antioxidants by microwave-assisted extraction (MAE) was proposed as an alternative for the valorization of these by-products. To meet this objective, the effect of power (200, 300 and 400 W) and extraction time (120, 180 and 240 s), and of the solvent/solid (L/S) ratio (30, 50 and 70 mL/g), on the content of phenolic compounds and the antioxidant capacity of the extracts was evaluated, using 63% ethanol as solvent, and following a Box-Behnken experimental design. The composition of phenolic compounds for CBS was determined by UHPLC-DAD. CPH and CBS extracts obtained under optimal conditions were evaluated for their cytotoxic activity on HT-29 (colorectal adenocarcinoma), A549 (lung adenocarcinoma), CAL-27 (squamous cell carcinoma of the tongue) and MCF-7 (mammary gland adenocarcinoma) tumor cell lines. The results showed that for cocoa pod husk, extraction power and L/S ratio were the most influential factors on the response variables, while for cascarilla, extraction time was more influential. The highest yield, phenol content and antioxidant capacity (FRAP, DPPH) for CPH under optimum conditions are obtained at 397.52 W; 233.98 s and 69.99 mL/g. In the cocoa bean shell the optimal conditions are obtained at 399.88 W; 217.42 s and 69.71 mL/g, finding that this last by-product is mainly composed of theobromine and caffeine. As for the in vitro evaluation on cell lines, the extracts of cocoa processing by-products showed low selectivity and cytotoxic activity.

Keywords: waste valorization; microwave-assisted extraction; antioxidant compounds; optimization; cocoa processing.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XVI
Introducción	1
1. Marco teórico	3
1.1 El cacao	3
1.1.1 Características generales	3
1.1.2 Producción	6
1.2 Subproductos del beneficio del cacao	7
1.3 Compuestos fenólicos y actividad antioxidante	10
1.4 Extracción asistida por microondas	13
1.4.1 MAE aplicada a cacao	16
2. Planteamiento del problema	21
3. Hipótesis y objetivos	23
3.1 Hipótesis	23
3.2 Objetivo general.....	23
3.3 Objetivos específicos.....	23
4. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa pod husk as valorization strategy	25
4.1 Resumen	25
4.2 Abstract.....	26
4.3 Introduction	26
4.4 Materials and methods	29

4.4.1	Sample preparation.....	29
4.4.2	Reagents.....	29
4.4.3	Conventional extraction	29
4.4.4	MAE optimization	30
4.4.5	Extraction yield.....	30
4.4.6	Determination of total phenolic content.....	30
4.4.7	Determination of the antioxidant activity	30
4.4.8	Extract colors	31
4.4.9	Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).....	32
4.4.10	Experimental design and statistical analysis.....	32
4.5	Results and discussion	32
4.5.1	Extraction effect on yield	32
4.5.2	Extraction effect on total phenolic content	34
4.5.3	Extraction effect on antioxidant capacity.....	37
4.5.4	Microwave power optimal conditions	39
4.5.5	Model analysis	40
4.5.6	CPH extract color.....	42
4.5.7	FTIR analysis	44
4.6	Conclusions	46
5.	Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa bean shell as valorization strategy	49
5.1	Resumen	49
5.2	Abstract	50
5.3	Introduction.....	50
5.4	Methods and materials	52
5.4.1	Sample preparation.....	52
5.4.2	Reagents.....	52
5.4.3	Conventional extraction	52
5.4.4	MAE optimization	53
5.4.5	Extraction yield.....	53
5.4.6	Determination of total phenolics content.....	53
5.4.7	Determination of the antioxidant activity	54
5.4.8	Extract colors	55

5.4.9 High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses	55
5.4.10 Experimental design and statistical analysis	56
5.5 Results and discussion	56
5.5.1 Extraction effect on extraction yield	56
5.5.2 Extraction effect on total phenolic content	58
5.5.3 Extraction effect on antioxidant capacity	62
5.5.4 MAE optimal conditions.....	65
5.5.5 Model analysis	66
5.5.6 CBS extracts color	67
5.5.7 HPLC analysis.....	69
5.6 Conclusion	71
6. Ensayo Citotoxicidad de extractos de CPH y CBS sobre células tumorales.....	73
6.1 Introducción	73
6.2 Materiales y métodos.....	75
6.2.1 Propagación y mantenimiento de líneas celulares.....	75
6.2.2 Preparación de extractos	76
6.2.3 Ensayo de citotoxicidad in vitro	76
6.2.4 Ensayo de reducción de resazurina	76
6.2.5 Análisis Morfológico	77
6.3 Resultados y discusión	77
6.3.1 Análisis Morfológico	82
7. Conclusiones y recomendaciones	87
7.1 Conclusiones	87
7.2 Recomendaciones	87
A. Anexo: Contribuciones	89
B. Anexo: Complemento.....	95
Bibliografía	103

Lista de figuras

	Pág.
Figure 4-1: Standardized Pareto charts for response variables: (a) extraction yield (EY), (b) total phenolic content (TPC), (c) DPPH radical scavenging activity, and (d) Ferric-reducing antioxidant power (FRAP).	35
Figure 4-2: Response surfaces plots for EY, TPC, DPPH and FRAP as a function of microwave power, extraction time, and L/S ratio.	36
Figure 4-3: Optimization multiple responses (400 W, 240 s and 67 mL/g), for extract CPH.	39
Figure 4-4: CPH FTIR spectra: blue for the spectrum of extracts obtained by MAE using optimal conditions (400 W, 240 s, and 67 mL/g), and red for the spectrum of extracts obtained by conventional extraction.....	44
Figure 5-1: Standardized Pareto Charts for the response variables A) Extraction yield (EY) B) total phenolics content (TPC) C) DPPH radical scavenging activity, and D) ferric-reducing antioxidant power (FRAP).	60
Figure 5-2: Response surfaces plots for EY, TPC, DPPH and FRAP as a function of microwave power, extraction time, and L/S ratio.	63
Figure 5-3: CBS extracts multiple responses optimization (399.88 W, 217.42 s, and 69.71 mL/g).....	65
Figure 5-4: RP-UHPLC CBS profiles at 290 nm: (A) under optimal conditions, and (B) under control conditions.....	69

- Figure 6-1:** Porcentaje de Viabilidad de extractos de cascarilla (CBS) y cacota (CPH) de cacao sobre líneas tumorales A549 y HT-29. 77
- Figure 6-2:** Porcentaje de Viabilidad de extractos de cascarilla (CBS) y cacota (CPH) de cacao sobre líneas tumorales CAL-27 y MCF-7. 78
- Figure 6-3:** Porcentaje de Viabilidad de extractos de cascarilla (CBS) y cacota (CPH) A. en línea tumoral L929 a 72 horas. B. Mezcla 1:1 de extracto de CBS y CPH sobre líneas A549, CAL-27, HT-29, MCF-7, L929..... 80
- Figure 6-4:** Los extractos de cascarilla y cacota de cacao no afectan ni la morfología ni el crecimiento de las células L929 después de 72 h de incubación a 100 µg/mL. **A.** Células sin tratamiento. **B.** Células tratadas con el mix 1:1 del extracto de cascarilla y cacota 100 µg/mL por 72 h **C.** Células tratadas extracto de cascarilla 100 µg/mL **D.** Extracto de cascarilla 100 µg/mL después de 72 h de incubación. 82
- Figure 6-5:** Los extractos de cascarilla y cacota de cacao no afectan ni la morfología ni el crecimiento de las células CAL-27 después de 72 h de incubación a 100 µg/mL. **A.** Células sin tratamiento. **B.** Células tratadas con el mix 1:1 del extracto de cascarilla y cacota 100 µg/mL por 72 h **C.** Células tratadas extracto de cascarilla 100 µg/mL **D.** Extracto de cascarilla 100 µg/mL después de 72 h de incubación. 83
- Figure 6-6:** Los extractos de cascarilla y cacota de cacao no afectan ni la morfología ni el crecimiento de las células A549 después de 72 h de incubación a 100 µg/mL. **A.** Células sin tratamiento. **B.** Células tratadas con el mix 1:1 del extracto de cascarilla y cacota 100 µg/mL por 72 h **C.** Células tratadas extracto de cascarilla 100 µg/mL **D.** Extracto de cascarilla 100 µg/mL después de 72 h de incubación. 84
- Figure 6-7:** Los extractos de cascarilla y cacota de cacao no afectan la morfología de las células HT-29 después de 72 h de incubación a 100 µg/mL. **A.** Células sin tratamiento. **B.** Células tratadas con el mix 1:1 del extracto de cascarilla y cacota 100 µg/mL por 72 h **C.** Células tratadas extracto de cascarilla 100 µg/mL **D.** Extracto de cascarilla 100 µg/mL después de 72 h de incubación. 85

Lista de tablas

	Pág.
Table 1-1: Composición química de los subproductos del cacao (g/100 g d.w.) (Soares & Oliveira, 2022).....	8
Table 4-1: Experimental conditions and yield results for optimized phenolic compounds MAE from CPH.	33
Table 4-2: ANOVA results for the assessment of factors' significance, based on F-test and <i>p</i> values for EY, TPC, DPPH, and FRAP, by MAE.	40
Table 4-3: Color coordinates of CPH extracts.	43
Table 5-1: Experimental conditions and results for CBS MAE optimization.	56
Table 5-2: ANOVA results for the assessment of MAE extraction factors' significance, based on F-test and <i>p</i> values.....	58
Table 5-3: CBS extracts' color coordinates	68
Table 5-4: CBS extracts retention time, UV, tentative identification and chromatographic area at 290 nm.....	70

Introducción

La producción de cacao ha tenido un incremento significativo en los últimos años debido a la priorización por parte del Gobierno Nacional. La Federación Nacional de Cacaoteros (FEDECACAO) reportó que la producción pasó de 58.633 toneladas en 2019 a 64.281 toneladas de grano seco en 2020, incrementándose en 10%. En Colombia el cacao se produce en 29 de 32 departamentos, siendo Santander el principal productor, seguido de Antioquia, Arauca, Tolima, Huila y Nariño (Fedecacao, 2020).

En la explotación cacaotera sólo se aprovecha económicamente los granos, lo cual representa aproximadamente un 10% de la masa del fruto fresco (Villamizar Jaimes et al., 2017), produciéndose como subproductos la cacota (CPH) y cascarilla (CBS), que son generalmente usadas como abono en las plantaciones, generando un problema de proliferación de hongos principalmente *Phytophthora* que posteriormente puede afectar frutos cercanos en la plantación (Compañía Nacional de Chocolates, 2019). Paradójicamente, estos subproductos contienen compuestos de valor agregado, como fibra dietaria, (hasta 60% en la cascarilla), proteínas (aprox. 11-18%) y polifenoles (1,8 – 5,8%) (Okiyama et al., 2018). El volumen de estos subproductos para 2021 se podría estimar en aproximadamente 9.414 toneladas de cascarilla y 593.744 toneladas de cacota.

En Colombia y en el mundo hay un crecimiento en la oferta de productos alimenticios benéficos para la salud humana. Existen alimentos a los que se les adiciona fibra, probióticos, prebióticos entre otros, no solo para darles un valor agregado, sino para acceder a nuevos mercados. Es por esta razón que los productores de diferentes cadenas alimenticias buscan la manera de aprovechar todos los subproductos y crear productos pensados en los diferentes consumidores. Este pensamiento no es ajeno a los cacaoteros, quienes al evidenciar los altos volúmenes de subproductos que actualmente se están produciendo y desaprovechando, han buscado alternativas para su comercialización y transformación. Sin embargo, para poder lograr este propósito es importante caracterizar y conocer los beneficios de estos subproductos.

Entre las opciones para valorizar los subproductos generados en el procesamiento del cacao, está el aprovechamiento de los polifenoles, siendo estos principalmente flavonoides, los cuales se pueden utilizar en la industria alimentaria en la elaboración de alimentos y bebidas funcionales (Ciprián, 2020). La obtención de estos compuestos por medio de tecnologías emergentes como extracción asistida con microondas y ultrasonido ofrecen ventajas, al aumentar los rendimientos del proceso, reduciendo los tiempos y temperaturas de extracción, al igual que al disminuir el uso de solventes, por lo que el uso de estas tecnologías se ha venido potenciando como alternativa a las tecnologías convencionales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la tecnología emergente extracción asistida por microondas (MAE) para la valorización de los subproductos del proceso de beneficio del cacao (cacota y cascarilla) con énfasis en contenido fenólico, compuestos antioxidantes y actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales. Para ello se usó material procedente del Departamento de Nariño, que fue sometido a un proceso de MAE empleando como solvente etanol al 63%. Se empleó un diseño experimental de tipo Box-Behnken para determinar el efecto de la potencia de extracción (200, 300 y 400 W), el tiempo de extracción (120, 180 y 240 s) y la relación solvente/sólido (30, 50 y 70 mL/g), en el rendimiento del proceso, contenido de compuestos fenólicos totales, capacidad antioxidante y actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales HT- 29, (adenocarcinoma colorectal), A549 (adenocarcinoma de pulmón), CAL-27 (carcinoma escamo celular de lengua) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria). Para la cascarilla se realizó caracterización de los extractos por UHPLC-DAD.

1. Marco teórico

1.1 El cacao

1.1.1 Características generales

El cacao (*Theobroma cacao* L.) pertenece a la familia botánica Malváceas, y es originario de la región del triángulo amazónico entre los países de Colombia, Ecuador y Perú (Motamayor et al., 2008).

El cacao es un árbol semi-caducifolio perenne que puede alcanzar alturas entre 15 a 20 m en condiciones naturales. Dentro de las condiciones más apropiadas para su crecimiento se encuentran rangos de temperatura entre los 18 a 23°C, precipitaciones entre los 1.500 y 3.000 mm/año y humedad relativa superior al 75% (Fedecacao, 2020), siendo Colombia un país donde en 29 de los 32 departamentos se siembra y produce cacao.

Colombia es uno de los principales países de América del Sur que produce cacao, por sus condiciones climáticas adecuadas para el crecimiento y producción de variedades como criollo, forastero y trinitario principalmente. El cacao criollo es una variedad que produce mazorcas de tamaño medio, pero granos grandes, aromáticas y de buena calidad, a diferencia del cacao forastero que produce mazorcas pequeñas de color amarillo cuando se encuentran maduras, esta variedad es más resistente a enfermedades que el anterior, y el cacao trinitario es un híbrido de las dos variedades anteriores, dentro de este grupo se encuentra el CCN-51 que presenta elevada producción y resistencia a enfermedades (Hernández, 2015). La variedad nacional se caracteriza por tener un sabor más refinado y menos amargo con un mayor valor económico, sin embargo, aproximadamente el 80% de la producción mundial es cacao variedad forastero (Soares & Oliveira, 2022). El clon de cacao TCS01 (*Theobroma Corpoica* La Suiza 01) es de tipo genético híbrido, procedente de mezclas de cacao trinitario, en cultivo es precoz, excelente en producción y calidad del

grano, este clon es reciente ya que fue lanzado en 2014 por Corpoica, actualmente existen muy pocas investigaciones en este clon por lo que es importante caracterizarlo.

El árbol de cacao entra en producción entre los dos y cinco años después de siembra, dependiendo de la variedad y condiciones de cultivo, aunque la fructificación se da durante todo el año, hay dos periodos de mayor producción. El fruto es considerado una baya que comúnmente se denomina mazorca, las cuales contienen entre 20 y 60 o más granos en su interior embebidas en una pulpa mucilaginoso agrídulce (Hernández-Hernández, 2018).

La cadena de transformación del fruto de cacao comienza con la recolección de las mazorcas de cacao maduras, las cuales se quiebran y se retiran las almendras con el mucilago, posteriormente los granos de cacao son depositados en los fermentadores (Orozco, 2020).

La fermentación tiene dos fases. Inicia con una fase anaerobia donde se comienza con la transformación de los azúcares de la pulpa en alcohol, las levaduras hidrolizan los carbohidratos y proteínas presentes en el mucilago que rodea los granos de cacao para convertirlos en etanol y dióxido de carbono, a medida que el mucilago se degrada el pH disminuye (Castañeda., et al 2016; Dircks, 2009). La segunda fase es la aerobia, en ella se forma ácido acético, aumenta la temperatura, generando crecimiento de bacterias de ácido lácticas, que fermentan los azúcares que producen ácido láctico y asimilan el ácido cítrico. La asimilación del ácido cítrico hace que el pH de la pulpa aumente permitiendo el crecimiento de otras bacterias. Esto coincide con una rápida disminución en la población de levaduras, por agotamiento de las fuentes de energía (poca cantidad de azúcar en la pulpa). Las bacterias del ácido acéticas metabolizan el etanol y lo transforman en ácido acético a través de un proceso exotérmico, responsable del aumento final de la temperatura en la masa de fermentación. El etanol y el ácido acético penetran el interior de los granos originando la muerte del embrión y desencadenan una serie de reacciones catalizadas por enzimas endógenas como la proteólisis de proteínas de almacenamiento, generando péptidos y aminoácidos libres, también se genera la hidrólisis de la sacarosa, formando azúcares como glucosa y fructosa (Beckett, 2009). Por otro lado, los granos empiezan a hincharse debido a la penetración del ácido acético y cambian de color en su interior debido a la degradación de las antocianinas y oxidación de los polifenoles (flavonoles y procianidinas) por efecto de la enzima polifenol oxidasa disminuyendo

paralelamente también la astringencia (Jinap et al., 2004), estos cambios van desde los bordes hacia adentro (Ramos et al., 2020).

Los granos de cacao por naturaleza son amargos y astringentes, sin embargo, los procesos que tienen mayor impacto en el grano y posteriormente en la cascarilla, son la fermentación, secado y tostado (Di Mattia et al. 2017), siendo el proceso de fermentación el que descompone los compuestos amargos y crea nuevos compuestos que contribuyen a la generación de sabor y aroma del chocolate. Varios factores pueden influir en el proceso de fermentación, como el tipo de grano de cacao, el lugar donde se cultiva y el método de fermentación utilizado. Existen varios métodos de fermentación del cacao, como tradicional en pilas, en cajas y en bandejas, cada método tiene sus ventajas e inconvenientes, y la elección dependerá de la variedad de cacao en grano y del perfil de sabor deseado.

El grado de fermentación influye en los componentes del cacao por ejemplo Afoakwa et al. (2011) observaron que los contenidos de proteína y grasa fueron superiores en los granos sin fermentar y que los contenidos de micronutrientes también disminuyeron con la fermentación, pero aumentaron con el tiempo de almacenamiento, y Di Mattia et al. (2017) reportaron que la cantidad de polifenoles disminuye en los granos y aumenta en la cascarilla dependiendo del grado de fermentación, una fermentación excesiva puede dar lugar a un sabor ácido, mientras que una fermentación insuficiente puede producir un perfil de sabor plano.

Finalizado el proceso de fermentación, los granos se secan para reducir su humedad hasta 6-8% (Beckett, 2008). Posteriormente se realiza el proceso de tostado y descascarillado. Los granos descascarillados se muelen (Orozco, 2020) y se pueden producir cuatro productos principalmente (licor de cacao, manteca de cacao, pasta de cacao y cacao en polvo), y productos finales como el chocolate y sus derivados a través de diferentes procesos industriales.

En el proceso de industrialización del cacao se producen diversos subproductos, entre los cuales se encuentra la cáscara de la mazorca o cacota, el mucílago y la cáscara del grano conocida también como cascarilla (Hernández Hernández, 2018).

1.1.2 Producción

De acuerdo con la Organización Internacional del Cacao ICCO (2022) para el período 2020-2021 la producción mundial de grano de cacao ascendió a 5.242.000 toneladas, siendo los principales países productores Costa de Marfil, Ghana, Ecuador, Camerún, Nigeria y Brasil, el 77% procedían de África, primer productor mundial, el 17% de las Américas y el 6% de Oceanía (Fedecacao, 2021). En América Latina los principales productores de cacao son Ecuador, Brasil, Perú, República Dominicana y Colombia.

En Colombia la producción de cacao ha tenido un incremento significativo en los últimos años debido a su importancia económica y gran potencial para el mercado interno y externo. La producción de cacao en Colombia incrementó en un 10% en el 2020 pasando de 58.633 toneladas en 2019 a 64.281 toneladas de grano seco en 2020 (Fedecacao, 2020). El departamento de Santander es el mayor productor con 26.315 toneladas y una participación del 41% de la producción nacional, seguido en su orden por Antioquia con 5.974 (9%), Arauca con 5.082 (8%), Tolima con 4.312 (7%), Huila con 4.197 (7%) y Nariño con 2.980 toneladas de grano seco de cacao correspondiente a una participación del (5%) (Fedecacao, 2021).

El cacao en Colombia es cultivado principalmente por agricultores de pequeña escala, quienes poseen parcelas de tres hectáreas en promedio. Mientras que la demanda mundial de cacao ha aumentado, en Colombia se ha incrementado la producción y disminuido las importaciones de cacao. Sin embargo, existen muchas plantaciones tradicionales que impactan el promedio nacional de productividad. La mayor parte del cacao producido en Colombia se destina al mercado nacional, para producción de chocolate de mesa. Las empresas que dominan el mercado interno son Nutresa – Compañía Nacional de Chocolates y Casa Luker (Zamora & Ochoa, 2020).

Desde el año 2012, Colombia ha estado aumentando sus exportaciones de cacao en grano por su reconocimiento como cacao fino y de aroma. En 2019, unas 4.948 toneladas se exportaron principalmente a México, Malasia y Bélgica, y el restante a otros países como Estados Unidos y Argentina (Meza-Sepúlveda et al., 2021). Actualmente, Colombia exporta granos de cacao fermentados y secos, cascarilla de cacao, cacao en pasta, manteca de cacao, aceite de cacao, cacao en polvo sin azúcar añadido y otros alimentos que contienen cacao a 72 países (Zamora y Ochoa, 2020).

Los subproductos del beneficio del cacao se han comercializado principalmente para desarrollos industriales. En el año 2020 se reportaron 231 toneladas exportadas de cacota, lo cual representa aproximadamente \$225 millones de dólares. Los principales países exportadores de este subproducto son Costa de Marfil y Alemania, y los países importadores de cacota y cascarilla, entre otros subproductos del cacao, son principalmente Países Bajos, Francia, Bélgica y Alemania (ITC, 2022).

1.2 Subproductos del beneficio del cacao

El cacao es un producto reconocido principalmente como materia prima para la producción de chocolate; sin embargo, sus granos son la fuente de muchos otros productos. Durante su procesamiento se obtienen como subproductos la cacota (CPH, por sus siglas en inglés “Cocoa Pod Husk”), mucilago y cascarilla (CBS, por sus siglas en inglés “Cocoa Bean Shell”) (Molano, 2021).

En la explotación cacaotera solo se aprovecha económicamente los granos de cacao. Expertos en la fabricación de productos a base de cacao, indican que el rendimiento de 100 kg de granos de cacao es alrededor del 85%. La CBS representa el 12% del peso del grano (Murillo, 2008), mientras que la CPH representa entre el 86 al 90% del peso fresco del fruto (Herrera et al. (2020), Villamizar Jaimes et al (2017)). La CPH es el principal subproducto de la industria del chocolate, y por su volumen importante, se ha convertido en una oportunidad de renovación económica y ambiental, ya que por cada tonelada de grano seco de cacao se generan diez toneladas de CPH húmedo (Vaštyl et al., 2022).

Teniendo en cuenta los datos anteriores, y que en Colombia para el año 2021 hubo una producción de 64.281 toneladas de grano seco de cacao, se podría estimar que se generaron 593.744 toneladas de CPH, y 9.414 toneladas de CBS.

Dada la composición química de CPH y CBS, varios estudios han propuesto estrategias para su valorización. La CPH presenta generalmente bajo contenido de lípidos (1,5%), alto contenido de cenizas (6,7%), proteína (8,6%), fibra dietética total (36,6%) compuesta principalmente de fibra insoluble (74%) y fenoles solubles (4,6%), carbohidratos (32,3%) y lignina (21%) (Vriesmann et al., 2011). Los resultados obtenidos por Chun, Husseinayah y Yeng. (2016) indican que la CPH contiene lípidos (1,5%), cenizas (9%), proteína (2,1%),

carbohidratos (17,5%), lignina (24,2%), celulosa (26,4%), hemicelulosa (8,7%) y humedad de 10.5%. La Tabla 1-1 presenta la composición de CPH y CBS.

Table 1-1: Composición química de los subproductos del cacao (g/100 g d.w.) (Soares & Oliveira, 2022).

Componente	Cacota (CPH)	Cascarilla (CBS)
Carbohidratos	29,04 - 32,3	17,80 – 23,17
Celulosa	24,04 – 35,00	15,10
Hemicelulosa	8,72 – 11,00	-
Lignina	14,60 – 26,38	32,41
Pectina	6,10 - 9,20	0,57 – 1,50
Fibra dietaría total	36,60 – 56,10	18,60 – 60,60
Proteína	4,21 – 10,74	15,79 – 18,10
Lípidos	1,50 – 2,24	2,02 – 6,87
Grasas	6,70 – 10,02	5,96 – 11,42
Minerales (mg/100 g)	3230,85	56,75 – 312,57
Fenoles Totales*	4,60 – 6,90	1,32 – 5,78
Antocianinas**	-	0,40
Teobromina	0,34	1,30
Cafeína	-	0,10
Taninos	5,20	3,30 – 4,46
Flavonoides**	-	1,50

*(g ácido gálico/100 g) y **(μ g quercetina/100 g).

Por su parte para la CBS diversos trabajos se han centrado recientemente en el estudio de su composición y propiedades. La CBS presenta un alto contenido de proteínas (>12 g/100g d.w.) que contienen todos los aminoácidos esenciales. CBS ha sido recomendada como fuente de fibra dietética en productos de confitería, aperitivos y productos de panadería con alto contenido de fibra y bajo valor calórico (Hernández, 2018). Okiyama et al. (2018) mencionan que la CBS es un material rico en alcaloides, catequina, epicatequina, procianidina B2, cafeína y teobromina. Esta información es confirmada por Barbosa-Pereira et al. (2018) quienes realizaron la huella química de la CBS de Venezuela. Entre los 39 compuestos químicos identificados en las muestras, las metilxantinas fueron

el grupo más representativo encontrado. La teobromina se encontró en concentraciones más altas que la cafeína. Se identificaron ácidos fenólicos como el ácido protocatéquico, y compuestos como catequina y epicatequina, al igual que un total de 18 compuestos como la procianidina tipo B, dímeros y trímeros y glucósidos de procianidina tipo A.

Para la industria cacaotera, representa un problema deshacerse de los desechos producto del proceso de fermentación de los granos de cacao, los cuales generan impactos ambientales negativos. Por esto, actualmente se están desarrollando estudios que permitan dar un valor agregado a estos subproductos, buscando aumentar el beneficio económico para los productores de cacao (Murillo, 2008).

El CPH es una fuente abundante, económica y renovable de compuestos bioactivos como fibra, pectina, compuestos antioxidantes, minerales y teobromina, los cuales tienen efectos benéficos en la salud humana (Vaštýl et al., 2022), destacándose el valor agregado que se puede lograr con este valioso subproducto industrial para generar nuevos productos farmacéuticos, dermatológicos, productos médicos, combustibles, nutracéuticos o alimentos funcionales (Campos-Vega et al., 2018). Varios autores han realizado investigaciones y referencian el uso de la cacota como antibacterial, antifúngico (Yahya et al., 2021), para la elaboración de espumas de poliuretano (Sarmiento Hernández, 2019), material formado de cacota y polipropileno denominado biocomposito (Rojas, 2019), potencial energético (Lock-Navarro, 2018), como aditivo para la elaboración de jabones (Orozco, 2020) igualmente como ingrediente de diferentes alimentos como brownie, arequipe y sopa instantánea (Gutiérrez y López, 2018).

Debido a la composición química de la cascarilla, se han propuesto estrategias de valorización, entre ellas el uso de extracto de cascarilla por sus propiedades antibacterianas (Cuéllar et al., 2012; Tamrin Faradilla et al., 2020) y antimicrobial (Rojo-Poveda et al., 2019a). Soares & Oliveira, (2022) realizaron una revisión de otros usos en donde se destaca el extracto de cascarilla como estabilizante en aceite de soya, y el uso de cascarilla molida en envases activos conservando los alimentos por más tiempo, como absorbente, en la alimentación de pollos y conejos, el uso de harina para realizar galletas, entre otros. En el uso alimentario también se reporta el uso de CBS molida como materia prima para te de cascarilla de cacao (Valbuena Coca & Serrano Acevedo, 2018; Dos Antojos Lopes et al., 2021), una infusión con buena aceptación (Tapia, 2015; Sangronis et al., 2014), con respecto a este último uso, se han realizado estudios de bioaccesibilidad

por ejemplo el realizado por Cantele et al. (2020) quienes investigaron la bioaccesibilidad de polifenoles y metilxantinas después de la digestión in vitro de cápsulas y bolsitas de té, encontrando una bioaccesibilidad de 100% de las metilxantinas y de 50% de polifenoles totales, se destaca la aceptabilidad por parte de los consumidores de estas cápsulas y del té. En otro estudio se realizó un helado con incorporación de CBS molido, encontrando que puede ser efectivo en la prevención del daño a la integridad intestinal asociadas a las reacciones oxidativas e inflamatorias generadas por agentes dietéticos (Rossin et al., 2021).

1.3 Compuestos fenólicos y actividad antioxidante

Los compuestos bioactivos son sustancias químicas que intervienen en el metabolismo secundario de los vegetales. En las plantas, debido a su estructura química tan diversa, cumplen con diferentes funciones como pigmentos, aromas, reguladores del crecimiento y reproducción, protectores naturales frente a parásitos. Aunque no son consideradas sustancias esenciales en humanos, ya que no se requieren para el metabolismo, a largo plazo son indispensables en la salud ya que intervienen ejerciendo un efecto protector del sistema cardiocirculatorio, reductor de la presión sanguínea, regulador de la glucemia y la colesterolemia, reductor del riesgo de cáncer y mejorador de la respuesta defensivo-inmunitaria del cuerpo (Oracz et al., 2015).

Los terpenoides (carotenoides y esteroides); compuestos fenólicos y compuestos azufrados, han sido catalogados como los tres grandes grupos de compuestos que representan los compuestos bioactivos. Entre estos, los compuestos fenólicos son de gran interés, dado que aportan a la actividad antioxidante y en algunos casos ayudan a la prevención de enfermedades crónicas como hipertensión, diabetes y procesos inflamatorios (Coelho et al., 2019).

Los compuestos fenólicos constituyen un grupo de sustancias químicas que se caracterizan por presentar un anillo aromático, un anillo de benceno, con uno o más sustituyentes hidroxilos incluyendo derivados funcionales como ésteres, metil ésteres y glicósidos (Vázquez et al., 2016). Entre los compuestos fenólicos del cacao predominan los flavonoides, que contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual los dos anillos aromáticos están unidos

por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo (Díaz & Hernández, 2020).

Los antioxidantes son sustancias que tienen la propiedad de inhibir o prevenir las alteraciones oxidativas que puede sufrir una molécula. Entre los principales antioxidantes naturales se encuentran los compuestos fenólicos, el ácido ascórbico, el α -tocoferol, los carotenoides, siendo encontrados con mayor frecuencia en los frutos, semillas y aceites vegetales (García et al., 2011).

Los procesos de oxidación se presentan de forma espontánea en los seres vivos y los alimentos, produciendo radicales libres y especies reactivas de oxígeno, cuyo desbalance produce generalmente afectaciones o cambios por oxidación (Herrera & Castro, 2016). La defensa para reducir tal desbalance son los compuestos antioxidantes, son sustancias que protegen al organismo de los radicales libres, especies químicas que en su estructura tienen un electrón desapareado en capacidad de aparearse, lo que los hace altamente reactivos y debido a esta condición pueden ocasionar daños al organismo a nivel celular. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que destruye nuestras células. Los antioxidantes están presentes en fuentes naturales (frutas, verduras, hierbas, algas, especias, entre otros) o sintéticos y son compuestos que retrasan la autooxidación al inhibir la formación de radicales libres o al interrumpir la propagación del radical libre por uno o varios mecanismos (Brewer, 2011).

La extracción de estos compuestos fenólicos y antioxidantes es realizada principalmente por métodos tradicionales, uno de estos métodos es la agitación, el cual es usado por Ordoñez et al. (2019) quienes cuantificaron los polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos de corteza y semillas de cada uno de los siguientes frutos tuna, cacao (CPH y CBS), uva y uvilla, encontrando que en cuanto a polifenoles las semillas de todos los frutos presentaron los mayores valores seguido de la corteza o piel; en cuanto a la actividad antioxidante encontraron mayores valores en la piel, con respecto al cacao, la cascarilla en los dos análisis presentó mayores valores en comparación con la cacota de cacao. Se usan diferentes solventes como etanol, metanol, acetona o mezclas. Por ejemplo Martínez et al. (2012) usó etanol y una mezcla de metanol-acetona en los

subproductos del beneficio del cacao, obteniendo mayor contenido de fenoles y actividad antioxidante con la mezcla metanol-acetona para todos los subproductos.

Igualmente se han venido implementando otros métodos asistidos por agentes físicos, químicos o enzimáticos que permitan liberar con mayor facilidad los compuestos bioactivos, entre ellos la fermentación del cacao, la cual influye en la cantidad de compuestos bioactivos obtenidos en la cascarilla de cacao, estos compuestos proceden de la migración por solubilización desde el cotiledón a la cascarilla durante la etapa de fermentación del cacao (Nazaruddin et al., 2006). Esta información la corrobora Tiburcio, (2017) para CPH, donde encontró que CPH fermentado exhibió actividades antioxidantes superiores (DPPH y ORAC) comparado con el no fermentado, aunque este último presentó concentraciones más altas de compuestos fenólicos. Otro método es la extracción por hidrólisis térmica, los resultados mostraron que este método permite incrementar la extracción de compuestos bioactivos, obteniendo valores de 38,13 mg equivalentes Trolox (TE)/g residuo seco para la capacidad antioxidante, y 14,59 mg equivalentes de ácido gálico (GA)/g para el contenido de fenoles totales en cascarilla de cacao, sin embargo en ausencia de este tratamiento se obtuvieron, dependiendo del pH, valores entre 7,08 y 13,78 mg TE/g residuo seco para la capacidad antioxidante y entre 4,02 y 6,08 mg GA/g residuo seco para el contenido de polifenoles totales (Bernal Cedillo, 2021). Otro método es la extracción asistida por enzimas donde evaluaron celulasa y pectinasa (Botero et al., 2016).

En los últimos años tanto la ciencia como la industria se han centrado en encontrar nuevas tecnologías para la recuperación de fitoquímicos, que disminuyan los tiempos de extracción, el consumo de energía, en general el impacto ambiental de la extracción, usando métodos como ultrasonido, microondas, campos eléctricos pulsados, fluidos supercríticos entre otras (Mariatti et al., 2021). En cacao se han reportado extracciones verdes principalmente para la recuperación de pectina y compuestos fenólicos, usando métodos como extracción de líquidos a presión, extracción de agua subcrítica, extracción por ultrasonido y extracción por microondas. La extracción de líquidos a presión se ha usado en CBS, presentando valores de 186,4 y 379 $\mu\text{mol TE/g}$ en ensayos FRAP y DPPH respectivamente, mostrando poder antioxidante el cual está directamente relacionado con la composición en términos de compuestos fenólicos, mostrando que este método es efectivo para determinar el contenido de estos compuestos, sin embargo un aumento en

la temperatura y tiempos de extracción de 75° a 90° C presento una degradación de flavonoides por el método FRAP (Okiyama et al., 2018).

Extracción de agua subcrítica o también llamada agua caliente presurizada o extracción con agua sobrecalentada, es una de las tecnologías novedosas usadas por, (Jokić et al., 2018 citado por Mariatti et al., 2021) quienes la usaron para extraer fenoles de CBS, cambiando los parámetros, tiempo, temperatura y relación sólido/líquido, siendo la temperatura el principal parámetro que influyó en la extracción, obteniendo valores de 75,25 mg GA/g para los compuestos fenólicos del extracto de CBS.

1.4 Extracción asistida por microondas

Los métodos de extracción convencionales, que comprenden la hidrodestilación, extracción con solventes y destilación a vapor dependen de la selección de los solventes y de condiciones como la temperatura, la agitación, solubilidad, relación matriz-solvente, tamaño de la partícula, tiempo de extracción entre otros factores (Strati & Oreopoulou, 2014). Este conjunto de técnicas tiene ciertas desventajas asociadas principalmente al uso de estos solventes que representan un peligro tanto para la salud humana como para el medio ambiente y adicionalmente, estas tecnologías tienen un alto consumo energético, de costo de proceso y de tiempo (Singh et al., 2015).

En respuesta a mitigar las desventajas de los métodos convencionales o de baja presión actualmente empleados, surgen las tecnologías verdes, que se centran en el descubrimiento y diseño de nuevos procesos de extracción con reducción en requerimientos energéticos, recurriendo a solventes alternativos no peligrosos y productos naturales renovables mientras se garantizan unos extractos seguros y de alta calidad (Chemat et al., 2012). Dentro de estas tecnologías se encuentran la extracción asistida por ultrasonido, extracción líquida presurizada, extracción asistida por campos eléctricos pulsados, extracción enzimática, extracción con fluidos supercríticos, extracción asistida por microondas que son técnicas amigables con el ambiente (Singh et al., 2015).

El calentamiento con microondas es una tecnología que ha venido siendo muy utilizada por sus tiempos reducidos de operación debido al calentamiento más rápido que el calentamiento convencional, una mayor eficiencia energética, calentamiento más uniforme, un bajo impacto con el ambiente (Menéndez, 2017) y alta calidad general del

producto final. Las tecnologías de procesamiento por microondas, como el secado, el calentamiento y la esterilización por microondas, desempeñan un papel importante en el control de la calidad y la seguridad de los alimentos (Ortiz-Rodríguez, et al., 2022).

Debido a la naturaleza electromagnética, las microondas poseen campos eléctricos y magnéticos que son perpendiculares entre sí, el calentamiento se provoca por la rotación y la condición iónica, esta rotación genera un movimiento de las moléculas, produciendo colisiones con las moléculas circundantes, liberando energía térmica, originando un calentamiento muy rápido y de toda la muestra simultáneamente (Kaufmann & Christen, 2002).

Las microondas actúan selectivamente con las moléculas polares que están en los tejidos provocando la ruptura de las células y paredes y de esta manera la liberación de compuestos (Kaufmann & Christen, 2002). Esta selectividad es una ventaja en el proceso de extracción, ya que la radiación microondas interactúa con el disolvente usado para la extracción y con la matriz, lo cual permite extraer determinados productos y alcanzar elevadas eficiencias en el proceso. Por ejemplo, si se usa un disolvente completamente apolar que no absorberá microondas se maximiza la relación matriz vegetal/ disolvente, logrando que la radiación sea mayormente absorbida por el agua de la materia vegetal mejorando la ruptura del tejido celular, pero si se utiliza un disolvente más polar la situación cambia y sería más interesante usar una relación matriz vegetal/disolvente no tan elevada y maximizar la potencia de extracción, de esta manera la radiación sería absorbida por el disolvente, logrando disolver una mayor cantidad de producto objetivo en el disolvente (Bermúdez-Menéndez, 2017).

Comercialmente hay dos tipos de dispositivos microondas, el primero de uso doméstico usa un recipiente de extracción abierto bajo condiciones de presión atmosférica y a una temperatura bastante inferior a la de ebullición del disolvente, para evitar pérdidas, que provocarían un incremento de la concentración del producto a extraer y conllevaría a una disminución en el rendimiento (Bermúdez-Menéndez, 2017). El segundo usa un recipiente cerrado bajo presión y temperatura controladas y con una rotación para generar homogeneidad, este último puede calentar los disolventes a aproximadamente 100 °C, la temperatura se puede establecer en un valor fijo ajustando la potencia del microondas.

Tanto la velocidad de extracción como la eficiencia se mejoran en este procedimiento (Kaufmann & Christen, 2002).

La tecnología de microondas se ve afectada por una variedad de factores, entre los cuales se encuentran la potencia de microondas, tiempo de exposición, propiedades dieléctricas, profundidad de penetración y geometría, entre otras. Muchos factores interactúan entre sí afectando el calentamiento por microondas. Por ejemplo, altas temperaturas y potencias pueden dañar la microestructura de los materiales, afectando en gran medida la composición de los productos naturales, igualmente exponer un material o matriz a tiempos prolongados de extracción por microondas puede causar daño de la estructura. Dependiendo del tipo de componente a extraer se debe optimizar el proceso, en el caso de las vitaminas debido a su sensibilidad térmica no se pueden exponer a la radiación de microondas durante mucho tiempo, mientras que las proteínas pueden exponerse durante más tiempo debido a su escaso efecto de desnaturalización (Hu et al., 2021).

La extracción asistida por microondas ha sido usada en los últimos años para extraer diferentes compuestos, en diversas matrices. Por ejemplo, Otálora-Orrego & Martin (2020) reporta el uso de MAE para extraer carotenoides de zanahoria. Yaakob et al. (2020) usó este método para extraer lignina de la biomasa generada de la extracción de aceite de palma específicamente del racimo vacío, encontrando buenos rendimientos con el aumento de temperatura generado por este método. Singh et al. (2020) reporta el uso de esta metodología para la extracción más eficiente de clorofila de los filtros de extracción de caña de azúcar. En cuanto a la extracción de compuestos fenólicos y antioxidantes usando MAE se han reportado estudios en diversos productos como, desechos del tomate procesado industrialmente o también llamado pomasa de tomate (Reyes Melinao, 2021), pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) (Pérez-Loredo et al., 2017), frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Puertas et al., 2016), alperujo de aceituna o subproducto obtenido del centrifugado de la aceituna mientras se está obteniendo el aceite (Giralda Herguedas, 2017). En (*Citrullus colocynthis*) se probaron potencias de 520 y 1040 W, con tiempos de 2 y 10 min y una relación de sólido/líquido de 0,4 y 1 g/100 mL, encontrando que las condiciones óptimas de extracción eran 520 W; 2,67 min y 0,4 g/100 mL (Oke et al., 2022).

También se ha usado MAE para la extracción de pigmentos en paprika (Csiktusnádi Kiss et al., 2000), en microalgas, donde MAE fue identificado como el mejor proceso de extracción de pigmentos ya que combina rapidez, reproducibilidad, calentamiento

homogéneo y altos rendimientos de extracción comparado con la extracción por remojo en frío, en caliente y extracción asistida por ultrasonido (Pasquet et al., 2011). Las microalgas también han sido usadas para la extracción de bioaceites extraídos con microondas para obtener biocombustibles llamados de tercera generación (Bermúdez-Menéndez, 2017).

Otro uso que se le ha dado a esta tecnología emergente es la optimización de las condiciones de deshidratación con microondas y conservación de los compuestos fenólicos de semillas de mango, Zavala Zavala et al. (2020) evaluarán las condiciones óptimas para deshidratar semillas de mango manteniendo la mayor cantidad de compuestos fenólicos, reportando que 150 g de semilla a una potencia de 460 W, por 15 min son las condiciones óptimas, obteniendo (180,75 mg GA/100 g) en comparación con la semilla fresca (67,01 mg GA/100 g).

Se ha demostrado que MAE es eficaz como pretratamiento para la extracción de lípidos (Guerra et al., 2014 citado por Kumar et al., 2021). Kumar et al (2018) compararon la extracción mecánica y MAE como pretratamiento para la extracción de aceite en semillas de (*Pongamia pinnata*), extrayendo con éxito este aceite a una potencia de 600 W en 14 min y con una mejor calidad que la extracción mecánica.

1.4.1 MAE aplicada a cacao

La extracción asistida por microondas es una técnica moderna, que ha sido usada en cacao, pero principalmente para extraer compuestos de los subproductos del proceso de beneficio del cacao, como lo son (CPH) y de (CBS), a continuación, se relacionan algunos estudios usando extracción asistida de microondas en cacao o sus subproductos.

MAE ha sido usada en cacao para extraer compuestos como es el caso de Rahayu et al. (2019), quienes investigaron el mejor tiempo de extracción para la catequina de (CPH), encontrando que una extracción de 10 min era el tratamiento óptimo. Rahmawati et al. (2021) la usó para extraer las antocianinas de la cáscara de cacao, las condiciones evaluadas fueron tamaño de partícula, relación material/disolvente (p/v), tiempo de extracción y potencia de microondas, determinando que las condiciones óptimas son tamaño de partícula malla 60, relación CPH/etanol 0,0625 p/v , 10 min a una potencia de 450 W, para obtener un valor óptimo de respuesta de la concentración de antocianinas de 1.435 mM. Del subproducto CBS Ibrahim et al. (2020) extrajeron β -sitosterol usando como

solvente etanol y condiciones óptimas de 500 W de potencia, una temperatura de 70 °C y una duración de 10 min, obteniendo 3546,1 mg de fitoesterol/100g, este valor es 13% superior al rendimiento obtenido por la metodología de maceración convencional.

Otro producto extraído del cacao es la pectina. Pangestu et al. (2020) analizó el rendimiento de la extracción para separar la pectina de la cacota de cacao mediada por el agente acidificante ácido oxálico, evaluando el efecto del pH, la relación de líquido a sólido y el tiempo de irradiación en la cantidad de pectina obtenida, encontrando que a menor pH y un mayor tiempo de irradiación por microondas aumenta el rendimiento, pero se disminuía el grado de esterificación; esta técnica también redujo significativamente el tiempo de extracción en comparación al método convencional. Estos resultados son similares a los reportados por Sarah et al. (2020) quienes usaron una potencia de microondas de 300 W por 30 min usando ácido cítrico y ácido clorhídrico, el tratamiento MAE con ácido cítrico resultó en un rendimiento del 42% y pectina de alta calidad en comparación con el tratamiento MAE con HCl.

En un estudio realizado por Flórez-Montes et al. (2021) se evaluó la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos por cuatro métodos diferentes, extracción con solvente, Soxhlet, extracción asistida por ultrasonido y extracción asistida por microondas, siendo este último método de extracción con el que obtuvieron los más altos contenidos de fenoles y antioxidantes, resaltando que la extracción por microondas requiere cortos periodos de tiempo, bajos requerimientos energéticos y bajo consumo de agua. Herrera Ardila en (2013) comparó las técnicas de extracción de microondas y ultrasonido para la obtención de compuestos antioxidantes de granos secos y sin fermentar de cacao, encontrando que la técnica de microondas permite una mayor extracción de estos compuestos, usando una relación solvente/muestra 25 mL/g, potencia de 330 W, tiempo de 15 min y 2 ciclos de extracción.

Se han realizado varios estudios para obtener compuestos fenólicos de CPH por medio de la extracción asistida por microondas. Sin embargo, cada uno es realizado en condiciones diferentes, como se relaciona a continuación. Mashuni Hamid et al. (2020) utilizaron 97% (v/v) de etanol como solvente, potencias de 100, 200 y 300 W y tiempo de extracción de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min, para evaluar la cantidad de compuestos fenólicos de este subproducto. En otro estudio se investigó la influencia de diferentes condiciones de deshidratación (secado al sol, secado con aire caliente, secado al vacío, secado infrarrojo

y secado por microondas) en CPH, siendo el método más efectivo el secado por microondas en cuanto a tiempo de secado (0,83 h) y retención de niveles más altos de fenoles totales (12,22 mg GA/g de muestra seca) y saponinas totales (31,51 mg EE/g muestra seca). Igualmente encontraron siete compuestos fitoquímicos incluyendo ácido gálico, teobromina, teofilina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina y (-)-galato de epigallocatequina, revelando que la CPH de cacao es una rica fuente de compuestos fitoquímicos para futuras aplicaciones en la industria nutracéutica o de alimentos funcionales (Nguyen et al., 2021a). Este último concepto lo refuerza el estudio realizado por (Nguyen et al., 2020) quienes optimizaron los parámetros de extracción asistida por microondas para saponinas de CPH, recomendando uso de metanol al 85%, una potencia de 600 W, tiempo de irradiación de 6 s/min por 40 min y una relación de 50 mL/g de disolvente para obtener la mayor eficiencia de extracción de saponinas y flavonoides que muestran una potente capacidad antioxidante de este subproducto del beneficio del cacao.

Mellinas et al. (2020) utilizó MAE para determinar rendimiento, contenido de fenoles totales y antioxidantes de CBS, optimizando los parámetros experimentales con la metodología superficie de respuesta, encontrando que los extractos de MAE obtenidos a pH 12 son ricos en proteínas (580 mg d.w), polisacáridos (370,4 mg) y polifenoles (35,9 mg GA/g), mostrando un importante desempeño antioxidante (35,5 mg TE/g), siendo el factor pH el que presentó una mayor influencia, ya que las condiciones alcalinas resultaron en mayores rendimientos de extracción y capacidad antioxidante, las condiciones óptimas de MAE se determinaron como 5 min, pH 12, 97 °C y relación sólido/líquido 0,04 g/mL mostrando mejor resultado que la extracción con solvente convencional. En la mayoría de las técnicas de extracción un mayor volumen de disolvente aumenta el rendimiento del proceso, pero en MAE un mayor volumen de disolvente puede disminuirlo, por lo que se hace necesario estandarizar esta variable para encontrar el punto óptimo (Xiao et al., 2008).

Otros usos de MAE están relacionados con el uso en nanopartículas, microencapsulación, obtención de biocarbón, deslignificación y determinación de grasa, como se describe a continuación. Las nanopartículas de selenio (SeNP) se sintetizan con éxito por calentamiento por microondas mediante el uso de extracto de cascarilla de cacao como agente estabilizador y protector, las condiciones óptimas de síntesis se determinan como 15,6 min; 788,6 W y 0,14 g de selenio utilizando 50 mL de extracto de cascarilla (Mellinas

et al., 2019). El extracto de CPH ha sido microencapsulado para prolongar su vida útil y preservar sus propiedades antioxidantes, la composición de encapsulación tiene un efecto significativo sobre las propiedades fisicoquímicas y la retención de compuestos fenólicos y antioxidantes del extracto de CPH, Nguyen, et al. (2021b) sugiere realizar más estudios para mejorar la estructura del extracto de CPH y reducir costos y tiempos de proceso. Con respecto a la cacota de cacao fue sometida a pirólisis asistida por microondas a una potencia de 720 W por 15 min, para obtener un biocarbón, al cual se le evaluó la biosorción de iones de cadmio (II) en solución acuosa, obteniendo una capacidad de adsorción de 99.17% (Arcos Campues, 2022).

En cuanto a la deslignificación de CPH Muharja et al. (2021) realizaron la optimización del pretratamiento alcalino asistido por microondas para lograr la deslignificación de CPH, los resultados muestran que, al aumentar el tamaño de partícula, el contenido de lignina y celulosa disminuyó, mientras que la hemicelulosa aumentó, pero al prolongar el tiempo de irradiación, el contenido de lignina y hemicelulosa disminuyó mientras que la celulosa aumentó. Los autores del trabajo demostraron que la tecnología de pretratamiento alcalino asistido por microondas es un método efectivo. Con respecto a la determinación de grasa para cacao en polvo y nibs de cacao (pequeños trozos de cacao natural y tostado), las grasas se extrajeron utilizando diferentes solventes como éter de petróleo, hexano, acetona e isopropanol, los resultados mostraron que en comparación con los métodos convencionales, MAE se puede utilizar como un proceso más rápido de extracción de grasa y ofrece las ventajas de un bajo consumo de productos orgánicos que son costosos, corto tiempo de extracción, menor consumo de energía y excelente reproducibilidad (EIKhori et al., 2007).

2. Planteamiento del problema

A nivel mundial y principalmente en Colombia se han generado diversos programas gubernamentales que han incentivado la siembra y con ello la producción de cacao en diferentes regiones, principalmente en el Departamento de Santander y Nariño. En el proceso de beneficio del cacao solo se aprovecha económicamente los granos, los cual representa aproximadamente un 10% de la masa fresca del fruto, siendo el 90% residuo del proceso de beneficio. Los residuos o subproductos del beneficio del cacao son cacota, y cascarilla, actualmente estos subproductos son usados principalmente como abono en las plantaciones, generando un problema ambiental y de proliferación de hongos en las mismas plantaciones y frutos cercanos. Estos subproductos podrían ser aprovechados por los productores mediante su transformación o incorporación en productos alimentarios con beneficios principalmente a la salud por el alto contenido de fibra, compuestos fenólicos y antioxidantes, sin embargo, para lograr este propósito primero se debe caracterizar y conocer los beneficios de estos subproductos. Es por esto por lo que en este estudio se caracterizó la cascarilla y cacota del clon de cacao TCS01 proveniente del departamento de Nariño, mediante la optimización de extracción asistida por microondas como método más amigable con el medio ambiente para determinar el contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes de estos dos subproductos del beneficio del cacao, con estos extractos se evaluó la actividad citotóxica *in vitro* frente a células cancerígenas y de esta manera valorizar estos subproductos que actualmente están siendo desaprovechados en su gran mayoría y especialmente causan una problemática ambiental en las fincas productoras.

3. Hipótesis y objetivos

3.1 Hipótesis

La obtención de compuestos fenólicos y antioxidantes usando extracción asistida por microondas como alternativa más amigable con el medio ambiente frente a extracción convencional podría ser una alternativa de valorización a los subproductos generados del beneficio del cacao (cacota y cascarilla). Además, se espera que los extractos de cascarilla y cacota de cacao presente unos porcentajes de viabilidad celular muy bajos a algunas líneas celulares de cáncer.

3.2 Objetivo general

Evaluar la extracción asistida por microondas para la valorización de los subproductos del proceso de beneficio del cacao (cacota y cascarilla) con énfasis en compuestos antioxidantes y actividad citotóxica *in vitro* frente a células de cáncer de colon HT-29.

3.3 Objetivos específicos

- Definir las condiciones óptimas de extracción por microondas (potencia, tiempo de extracción y relación líquido-sólido) de los compuestos fenólicos de la cascarilla y cacota del cacao.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos etanólicos de la cascarilla y cacota del cacao.
- Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos obtenidos en condiciones óptimas frente a células de cáncer de colon HT-29.

4. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa pod husk as valorization strategy

Martha Cecilia Rincón, Carlos Eduardo Narváez, Luis-Felipe Gutiérrez

En este capítulo escrito en forma de artículo científico se describen los resultados obtenidos para la cacota, en relación con el contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes por los métodos DPPH y FRAP.

4.1 Resumen

La cacota de cacao (CPH) es un subproducto de desecho del procesamiento del cacao, la recuperación de compuestos bioactivos de este subproducto se ha considerado como una valorización estratégica. En el presente trabajo se utilizó un Diseño Box-Behnken (BBD) con metodología de superficie de respuesta, las condiciones del proceso se seleccionaron considerando como factores la potencia de microondas, el tiempo de extracción y la relación líquido/sólido (L/S) para optimizar la extracción asistida por microondas (MAE) y obtener un extracto enriquecido en compuestos fenólicos, a partir de este subproducto. Las variables de respuesta seleccionadas fueron rendimiento, contenido de fenoles totales (TPC) y capacidad antioxidante total (TAC representada por DPPH, FRAP). La potencia de microondas fue el factor que más influyó en la obtención de los mayores valores de TPC y TAC. El extracto obtenido en las condiciones óptimas 400 W; 240 s y relación L/S de 67 mL/g presentó un rendimiento del 44%, fenoles totales de (43,94 mg equivalentes de ácido gálico/g d.w.), la capacidad antioxidante para DPPH y FRAP fue de (430,80 μmol equivalentes trolox (TE)/g CPH) y (144,32 μmol equivalente trolox (TE)/g CPH) respectivamente. Los hallazgos de este estudio mostraron que los residuos agroindustriales que pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente representan

una fuente natural de compuestos bioactivos y su recuperación puede contribuir a la sostenibilidad económica y ambiental.

4.2 Abstract

Cacao pod husk (CPH) is a waste by-product during cacao processing therefore the extraction of bioactive compounds from it is regarded as strategic valorization. A Box-Behnken Design (BBD) along with a response surface methodology (RSM) were used in this research. The processing conditions were selected considering three factors: (1) microwave power, (2) extraction time, and (3) liquid/solid ratio (L/S); such factors allowed to make microwave-assisted extraction (MAE) optimal, to obtain a CPH-enriched phenolic extract. The selected response variables were (1) yield, (2) total phenolic content (TPC), and total antioxidant capacity (TAC, represented by DPPH, and FRAP). Microwave power was the most influential factor to obtain TPC and TAC higher values. The extract obtained in the optimal conditions (microwave power of 400W, 240 seconds of extraction time, and L/S ratio of 67 mL/g) had a yield of 44%, total phenolic compounds (43.94 mg gallic acid/g DW), and TAC of 430.80 $\mu\text{mol Trolox (TE)/g CPH}$ for DPPH, and 144.32 $\mu\text{mol Trolox (TE)/g CPH}$ for FRAP, respectively. These findings support the fact that agro-industrial waste by-products that potentially might have a negative environmental impact can actually represent a natural source of bioactive compounds. The recovery of these compounds can contribute to improving economic and environmental sustainability.

4.3 Introduction

In 2020/2021, a record worldwide production of cacao beans was estimated to be around 5,226 million tons (ICCO, 2022). In Colombia, for 2021, Fedecacao reported a total production of dried beans of around 69,040 tons.

From its harvesting, the processing of cacao beans produces waste by-products: ten tons per ton of dried beans (Murillo-Baca et al., 2020). The most important waste by-product is the cacao pod husk (CPH), which has become a significant environmental issue because of its high volume and air-polluting greenhouse gases (Rahayu et al., 2019). In Colombia, CPH waste by-products reached 600,000 tons by 2021.

In their research, Campos-Vega et al. (2018) show potential uses for CPH, which are divided into five main categories, each of them linked to their particular applications: (1) food industry (flavoring compounds, vegetable gum, texture agent, scent/flavor/color preservative, and probiotic encapsulation), (2) fuel industry (ethanol substrate, biodiesel catalyst, and charcoal and non-condensable gas [NCG] fuel source), (3) cosmetic and dermatological industry (skin whitening, moisturizers, sunscreens, wrinkle-reduction products), (4) pharmaceutical and medical industry (potash obtention, and nanoparticles synthesis against multi-drug resistant bacteria), and (5) other applications (lipase obtention, cleaning conditioning environmentally-friendly cream). From Lu et al. (2018) perspective, it is necessary to focus on physical, chemical, or biological pretreatment processes that can provide desirable fractions that, at the same time, are profitable and sustainable, especially in areas related to the food industry and more.

Since CPH is particularly rich in phenolic compounds, it can be a potential source of antioxidant fiber that can be used to supplement or completely compensate for the lack of this component in modern diets (Campos-Vega et al., 2018). This fact has been confirmed by Castillo et al. (2018), who have found that CPH-derived compounds can be potentially used in the composition of food products for special diets, because of their high fiber content, lower fat proportion, and a considerable quantity of polyphenols.

Because of their chemical composition, CPH-derived extracts contain proteins, polysaccharides, and peptides with an important biotechnological potential that can be further explored in search of high-added-value molecules (Porto de Souza Vandenberghe et al., 2022). In general terms, CPH has a lower moisture proportion, with a decent amount of fiber and sugars (43 and 45%, respectively), but a low percentage of fat (just 0.48%). It also contains a high percentage of polyphenols (21%), alkaloids such as theobromine and caffeine, and lignocellulosic compounds, such as hemicellulose (37%), cellulose (33%), lignin (23%), and pectin (3%) (Meza-Sepúlveda et al., 2021).

Conventional extraction techniques used to obtain CPH-derived compounds commonly use both elevated temperatures and solvents and consume prolonged periods (Sánchez-Camargo et al., 2021). Some authors have researched the CPH phenolic profile using different cacao varieties and also different solvent proportions, such as methanol-water (50:50 v/v), ethanol-water (50:50 v/v), acetone-water (70:30 v/v), and 70% ethanol

(Ordóñez et al., 2019; Villamizar & López, 2017; Rachmawaty et al., 2019; Miranda et al., 2020). On the other hand, other methods, such as mashing, stirring extraction, and high-temperature techniques (Martínez et al., 2012; Yapo et al., 2013; Delgado-Ospina et al., 2021), have been extensively used as conventional methods to extract phenolic compounds from CPH. However, new emergent technologies have been explored recently, such as ultrasound and supercritical fluids mediated-extractions, and microwave-assisted extraction (MAE), to phenolic compounds and antioxidants recovery, prior- and post-regular extraction processes (Sotelo et al., 2015; Valadez-Carmona et al., 2018; Nieto-Figueroa et al., 2019; Valadez-Carmona et al., 2017; Nguyen et al., 2020; Mashuni Hamid et al., 2020; Dewi et al., 2021).

MAE can be cataloged as an interesting alternative to conventional extraction techniques (Mellinas et al., 2020) because it allows faster and more homogeneous heating, while the sample container is closed, which produces an increase in pressure as a result of the increased temperature (Sánchez-Reinoso et al., 2020). In this sense, MAE can complete extraction processes in shorter times, with high reproducibility, and simplified controlled conditions, which result in a higher quality for final products (Chemat et al., 2020). This fact has been confirmed by Valadez-Carmona et al. (2017) who demonstrated the effects of three extraction methods (microwave-assisted, hot air, and lyophilization) over CPH phenolic compounds content and TAC: results showed that microwave-assisted extraction was the best drying method in comparison with hot air, and as good as freezing drying methods.

Considering the extensive cacao production in Colombia, and that its most important waste by-product is CPH, it is feasible to take advantage of it and use it in the food industry. Therefore, in this study, CPH from cacao variety TCS01 was researched, making optimal the extraction parameters for MAE, to obtain phenolic and antioxidant compounds. These parameters were optimized by Box Behnken Design and RSM.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Sample preparation

Cacao variety TCS01 from Nariño state (Colombia) was used as a raw source. CPH was collected and dried at room temperature, and subsequently, it was ground and sieved. Fractions with particle size of about 100 μm were retained for chemical characterization (proximal composition), as described by (Sánchez-Reinoso et al., 2020). Samples were packed in polyethylene bags and stored at -40°C until further use.

4.4.2 Reagents

All reagents used in the chemical analyses were of analytical quality and were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA), Merck (Darmstadt, Germany), and PanReac AppliChem. Pure absolute ethanol (PanReac AppliChem) and distilled water were used as solvents. DPPH 99%, and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (Trolox, $\geq 97\%$) were acquired from Merck. 2,4,6 TPTZ, sodium acetate trihydrate, ferric chloride hexahydrate, and gallic acid ($> 98\%$) were acquired from Sigma-Aldrich. Total phenols content determination reagent Folin-Ciocalteu (2N) was bought from Merck (Darmstadt, Germany). For UHPLC analyses, ACN was used, and water was provided through a Milli-Q device (Millipore, Milford, MA, USA).

4.4.3 Conventional extraction

Each sample was mixed with 20 mL of 63% ethanol solution and then stirred for 20 minutes at room temperature and centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes at 25°C . Then, the sample was filtered (separating the supernatant liquid), and the resulting sediment biomass was subjected to another extraction using the same 63% ethanol solution volume: this process was repeated four times. All the obtained extraction solutions were mixed, and ethanol was added until completing a 100 mL volume. This extract was stored in the dark at -40°C until it was time for further analyses. This extraction process was done for three CPH samples, differing in weight (control 1: 1.0005 g, control 2: 1.4001 g, and control 3: 2.3336 g).

4.4.4 MAE optimization

The MAE process was carried out with an ETHOS X (Milestone, Shelton, CT, USA) microwave system, composed of a rotor with twelve Teflon-enclosed containers with magnetic stirring. Following the method proposed by Sánchez-Reinoso et al. (2020), an ethanol-water solution (63% v/v) was used as a solvent, and an extraction volume was defined at 70 mL. Three extraction parameters were evaluated: (1) power, (2) extraction time, and (3) liquid/solid ratio, following the experimental design presented in Table 4-1.

After extraction, the containers were cooled down in an ice water bath for 15 minutes. Then, the obtained extracts were vacuum filtered (filter paper Whatman®, UK), and subsequently diluted until reaching a 100 mL volume using the same extraction solvent. Finally, extracts were stored in the dark at -40°C, until analyzed.

4.4.5 Extraction yield

From each obtained extract, a known aliquot was weighed, and the solvent was completely removed by an oven-drying process at 80 °C. In this way, the extraction yield (EY) was gravimetrically determined, reporting the results in weight percentage.

4.4.6 Determination of total phenolic content

TPC was spectrophotometrically assessed following a modified Folin-Ciocalteu method. 10 µL extract, 600 µL distilled water, and 50 µL non-diluted Folin-Ciocalteu reagent (2N), were mixed and stirred for one minute. After stirring, the mix was allowed to rest for two minutes, and then 150 µL 20% (W/V) sodium carbonate and 190 µL distilled water were added, letting reactions take place for two hours. Absorbance at 760 nm was measured by a spectrophotometer UV-vis V-530 (JASCO Corp., Tokyo, Japan). The calibration curve was carried out using gallic acid (0.031-1 mg/mL). Every single assessment was performed three times, and results were reported as gallic acid equivalent (GA) mg by sample dry weight (g) (mg GA/g DW CPH).

4.4.7 Determination of the antioxidant activity

- DPPH radical scavenging activity

The radical scavenging activity of the extracts was measured in vitro using a purple methanol DPPH solution (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), following a modified method from the one described by Brand-Williams et al. (1995). The solution was obtained by dissolving DPPH (3 mg) with methanol (80 mL) and stirring the mix for 30 minutes. 1950 μ L of the solution was vigorously mixed with 50 μ L of the extracts, and let rest at room temperature for one hour, in the dark. Absorbance at 517 nm was measured by a spectrophotometer UV-vis V-530 (JASCO Corp., Tokyo, Japan). Methanol was used as a blank. Trolox (Sigma Aldrich, USA) was used as a standard curve (0.15-1 mM). Each sample was analyzed three times, and the results were reported as μ mol Trolox by CPH (g) (μ mol TE/g CPH).

- **Ferric-reducing antioxidant power assay (FRAP)**

A FRAP stock solution was prepared by mixing (1) 300 mM acetate buffer (3 g CH₃COONa and 16 mL CH₃COOH) (pH 3.6), (2) 20 mM FeCl₃ solution, and (3) TPTZ solution (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine). This assessing solution had a ratio of 10:1:1 (acetate buffer: FeCl₃: TPTZ).

For the FRAP assay, a modified methodology based on the one developed by Yapo et al. (2013) was followed: (1) 20 μ L extract was mixed with 450 μ L FRAP solution, and 735 μ L distilled water in a disposable micro cell, (2) after resting the mix for 30 minutes in the dark, absorbance at 593 nm was measured in a spectrophotometer UV-vis V-530 (JASCO Corp., Tokyo, Japan), and (3) results were calculated based on a Trolox standard calibration curve (between 0.15 and 1 mM). Each sample was analyzed three times, and results were reported as μ mol TE by CPH (g).

4.4.8 Extract colors

Extract colors were measured by a Minolta CM-5 spectrophotometer (Konica Minolta, Tokyo, Japan), using a CIELAB system, a D65 illuminant, and 10° as vision angle. L* was registered as extract clarity, a* as coordinates towards red (positive values) or green (negative values), and b* as coordinates towards yellow (positive values) or blue (negative values). All measurements were carried out three times. Parameters for chroma (cab*) and hue (hab*) were calculated following what was established by Delgado-Ospina et al. (2021).

4.4.9 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR analyses were performed by a FT/IR spectrophotometer 4100 (JASCO Corp., Tokyo, Japan), using a range from 4000 to 600 cm^{-1} , 2mm/s as sweep speed, and a resolution higher than 4 cm^{-1} . Aliquots from each extract were spread evenly on zinc selenide (ZnSe) crystal cells, allowing the extracts to settle at room temperature before proceeding with the FTIR, to reduce any interference from water and ethanol. Spectra were collected through Spectra Manager software (2.13.00 version, JASCO Corp., Tokyo, Japan).

4.4.10 Experimental design and statistical analysis

A Box-Behnken Design was used to optimize the effects of the three variables considered for the MAE extraction operation: (1) microwave power (200, 300, and 400 W), (2) extraction time (120, 180, and 240 seconds), and L/S ratio (30, 50, and 70 mL/g). The aim was to obtain higher yields and values for TPC and CPH antioxidant activity. The Box-Behnken Design was composed of 17 assessments, as shown in Table 4-1. These assessments were programmed and optimized by Design Expert software (10.0.6 version, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA), replicating five times in the central point.

Data analyses were carried out with STATGRAPHICS 18. Results are reported as means, with standard deviations for every three measurements. An ANOVA analysis was equally performed to assess the effects of the considered variables on the MAE extraction operation. As a result, a multiple-response optimization was obtained considering the experimental factors.

4.5 Results and discussion

4.5.1 Extraction effect on yield

Obtained yields for CPH extraction are shown in Table 4-1. Obtained yields ranged between 32.49 and 42.92% and were influenced by the positive linear effect of the L/S ratio: when this factor increased from 30 to 70 mL/g, the extraction yield also increased considerably, as seen in Figures 4-2A, 4-2B, and 4-2C. This demonstrates the abundance of phytoconstituents in the extract. MAE is an extraction method for active compounds that uses heat and generates temperature gradients between the matrix cells and the solvent

phase. This makes easier solvent migration within the cells, improving mass transfer to the solvent phase (Sánchez-Camargo et al., 2021). Now, regarding extraction time and microwave power, the linear effect of these factors was negative, and not significant toward extraction yield.

The extraction yield was also influenced by the compounds' solubility within the used solvent for the extraction process (ethanol/water 63%, a polar solvent). Ethanol has a high capacity to absorb and dissipate microwave energy into heat. Additionally, it has been reported that adding water to the solvent increases the obtained yield, making the phenolic compounds in the sample reach the highest yield efficiency (Mashuni Hamid et al., 2020). Dewi et al. (2021) found the highest extraction yields for phenolic compounds using an ethanol/water 50% solvent. However, solvents with ratios between 35 and 65% also produced high yield values. Sánchez-Reinoso et al. (2020) reported that the most optimal extraction conditions can be obtained when a 63% ethanol solvent is used.

In general, the extraction yield values obtained through MAE were quite close to the ones obtained by conventional extraction control 1 (37.84%), and control 3 (32.94%). They tended to have the same increase in yield when there was an increase in the L/S ratio (Table 4-1). However, MAE can provide higher yields in shorter periods, in contrast with conventional extractions, thanks to the combined effect between heat and mass gradient generated (Mariatti et al., 2021).

Table 4-1: Experimental conditions and yield results for optimized phenolic compounds MAE from CPH.

Assay	Microwave power (W)	Extraction time (s)	Liquid-to-solid ratio (mL/g)	Extraction yield (EY) (%)	TPC (mg GA/g CPH)	DPPH ($\mu\text{mol TE/g CPH}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE/g CPH}$)
1	200(-1)	240(1)	50(0)	36,50	27.32 \pm 2.12	226.26 \pm 11.12	99.90 \pm 2.86
2	200(-1)	180(0)	70(1)	38,90	24.54 \pm 3.88	171.48 \pm 16.87	84.85 \pm 3.89
3	400(1)	180(0)	30(-1)	33,80	25.14 \pm 1.62	227.02 \pm 7.8	97.27 \pm 3.45
4	200(-1)	180(0)	30(-1)	32,49	17.69 \pm 0.86	144.69 \pm 6.81	92.30 \pm 0.58
5	400(1)	120(-1)	50(0)	37,01	25.92 \pm 1.98	214.45 \pm 5.64	103.81 \pm 3.48
6	200(-1)	120(-1)	50(0)	37,18	23.22 \pm 1.64	140.87 \pm 9.3	94.28 \pm 2.37
7	400(1)	240(1)	50(0)	42,92	39.57 \pm 2.22	325.60 \pm 7.73	123.75 \pm 4.13
8	300(0)	240(1)	70(1)	42,25	29.59 \pm 2.14	232.77 \pm 33.72	116.97 \pm 3.77
9	300(0)	240(1)	30(-1)	32,71	23.10 \pm 0.73	170.61 \pm 8.87	77.18 \pm 2.56
10	300(0)	120(-1)	70(1)	37,82	21.52 \pm 2.6	103.71 \pm 8.58	87.86 \pm 10.58
11	300(0)	120(-1)	30(-1)	34,65	21.62 \pm 1.98	146.01 \pm 5.11	82.54 \pm 6.02
12	400(1)	180(0)	70(1)	40,22	39.96 \pm 6.48	432.88 \pm 21.47	127.44 \pm 2.51
13	300(0)	180(0)	50(0)	39,87	27.03 \pm 0.64	198.53 \pm 10.9	95.39 \pm 2.03
14	300(0)	180(0)	50(0)	41,33	27.89 \pm 1.63	195.06 \pm 13.3	96.84 \pm 5.0
15	300(0)	180(0)	50(0)	36,92	27.64 \pm 1.04	171.11 \pm 15.37	95.19 \pm 10.29
16	300(0)	180(0)	50(0)	36,93	27.73 \pm 2.39	171.14 \pm 1.42	92.37 \pm 14.96
17	300(0)	180(0)	50(0)	36,47	24.57 \pm 0.39	174.24 \pm 7.73	96.59 \pm 2.31
Control 1			70	37,84	15.89 \pm 0.28	112.91 \pm 14.98	87.88 \pm 3.24
Control 2			50	34,26	16.83 \pm 0.71	114.92 \pm 9.71	89.74 \pm 6.02
Control 3			30	32,94	14.4 \pm 0.12	112.55 \pm 10.15	85.85 \pm 3.51

4.5.2 Extraction effect on total phenolic content

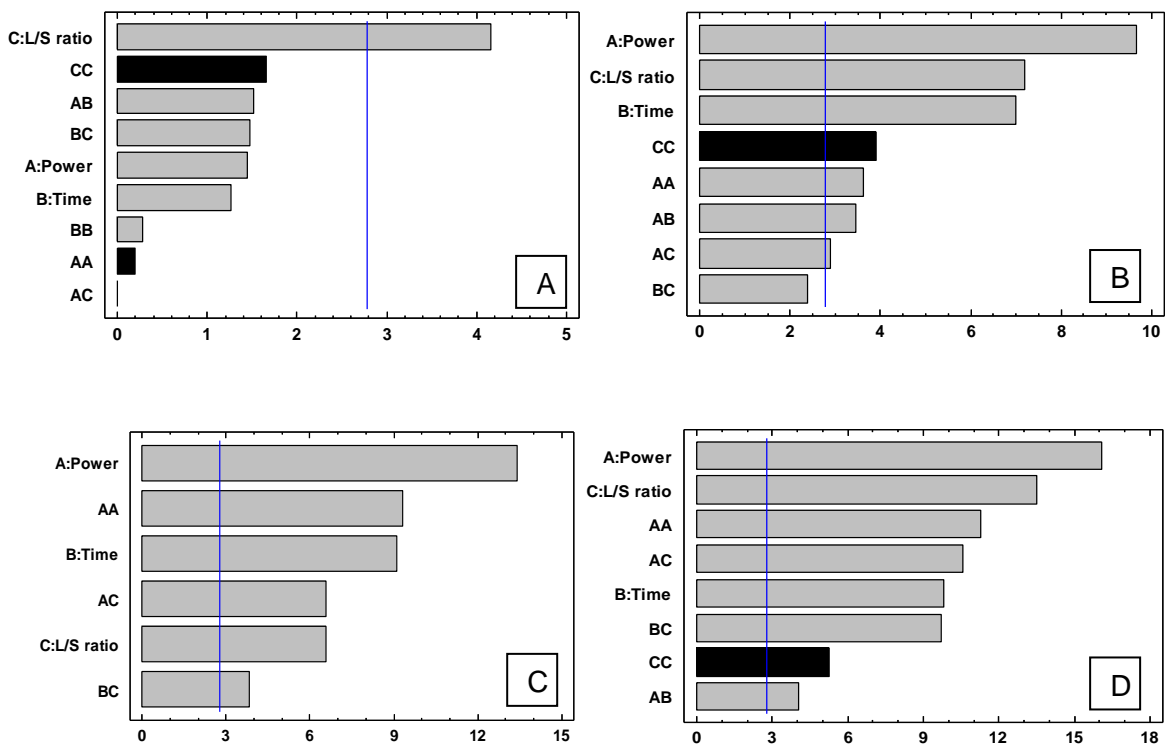
Table 4-1 shows that CPH total phenolic contents (TPC) ranged between 17.69 and 39.96 mg GA/g DW. The highest TPC values were found when the conditions were the following: 400 W (highest microwave power), 180 seconds as extraction time, and 70 mL/g as L/S ratio. Values under these optimal conditions were higher in comparison with the ones obtained through conventional extraction (16.83 mg GA/g DW). MAE has benefits associated with volumetric and selective heating effects, which are connected to a higher yield for phenolic extraction. Volumetric and selective heating allows electromagnetic energy to be directly transferred to the inner system resulting in quick heating, responsible for the reduction in extraction times (Dewi et al., 2021).

Image 4-1B shows Pareto charts for TPC. This variable was mainly influenced by the positive linear effect of the three MAE variables: microwave power, extraction time, and L/S ratio. The TPC extracted in this research was considerably higher in comparison with the TPC obtained by Martínez et al. (2012) (3.65 mg GA/g, using a methanol/acetone solvent), and by Delgado-Ospina et al. (2021) (8.44 mg GA/g, using two solvents: methanol/water, 80:20 v/v, and acetone/water, 70:30 v/v). Sotelo et al. (2015) reported TPC values around 23.01 mg GA/g in CPH extracts using ultrasound methods.

Now, in the specific case of MAE, Nguyen et al. (2020) used this TPC extraction methodology with 600 W as microwave power, 40 minutes of extraction time, and an L/S ratio of 50 mL/g using methanol as solvent (85% v/v). They extracted around 12.3 mg GA/g of TPC, a lower value contrasted to the ones found in this research, which considered lower extraction times and microwave power.

However, our extract values are similar to the ones reported by Nieto-Figueroa et al. (2020) and Valadez-Carmona et al. (2018). These researchers performed TPC extractions from CPH comparing drying by MAE, forced-air heat, extruded forced-air heat, and freeze-drying/lyophilization, and then using acetone: water: acetic acid as solvent. Their TPC extract values were 27.3 mg GA/g (MAE), 26.7 mg GA/g (forced-air heat), 24.8 mg GA/g (extruded forced-air heat), and 18.93 mg GA/g (freeze-drying/lyophilization).

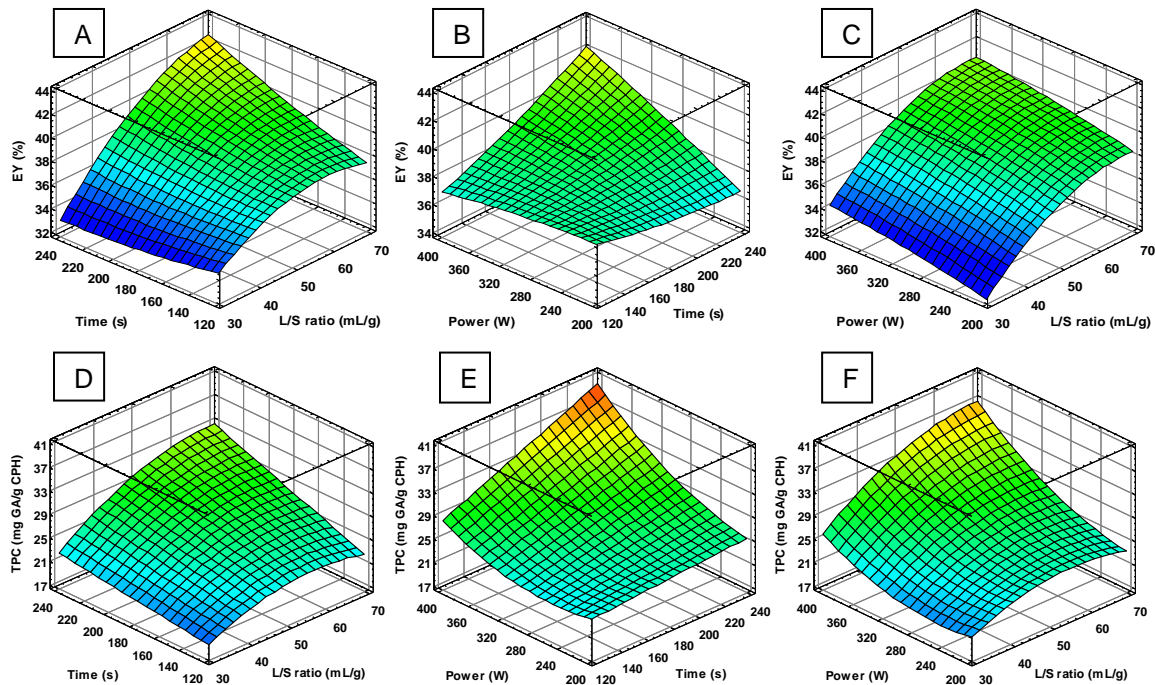
Figure 4-1: Standardized Pareto charts for response variables: (a) extraction yield (EY), (b) total phenolic content (TPC), (c) DPPH radical scavenging activity, and (d) Ferric-reducing antioxidant power (FRAP).

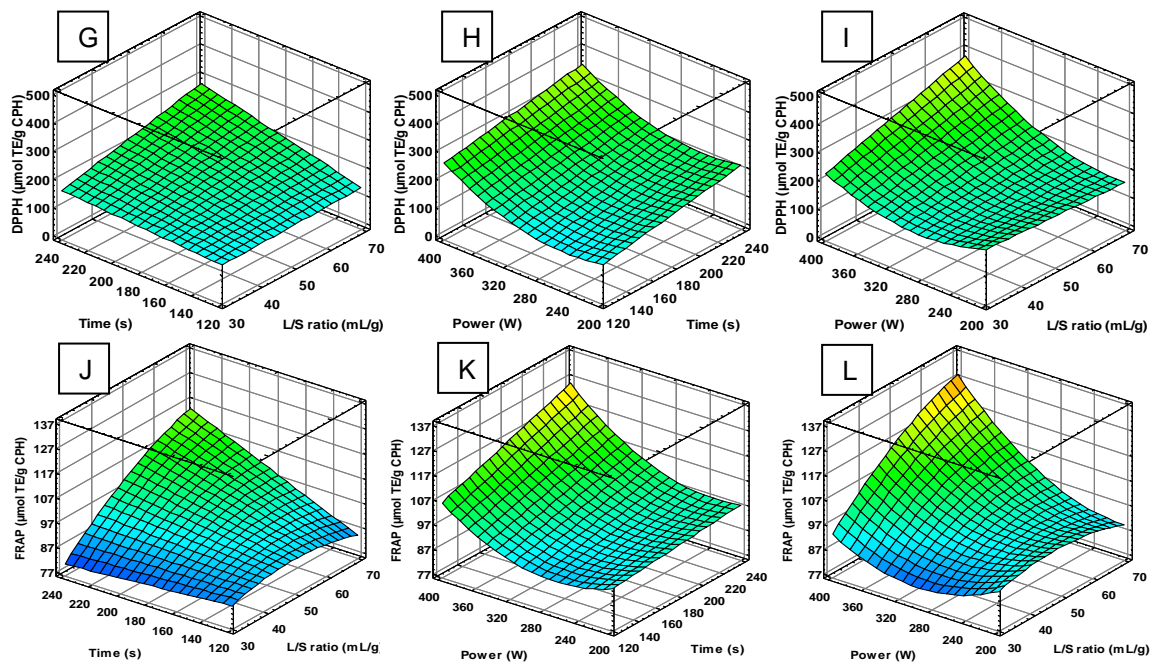


Response surface graphs and coefficients for the TPC regression equation are shown in Images 4-2D, 4-2E, and 4-2F, and Table 4-2, respectively. The graphs show that the

extraction process is dependent on the three analyzed factors, but it can be observed that, among them, microwave power is the one with the highest effect. Recently, Mashuni Hamid et al. (2020) obtained similar results: in their TPC extraction study from CPH through MAE, the most important factor in TPC obtention was microwave power. For them, the highest extraction was carried out at 200 W, and they attributed this to the molecular movement and heating caused by MAE, which resulted in a transfer of active compounds from vegetal cells into the solvent. They also used ethanol as a solvent, considering it suitable for CPH samples due to its easy cell-membrane penetration (Kayaputri et al., 2014).

Figure 4-2: Response surfaces plots for EY, TPC, DPPH and FRAP as a function of microwave power, extraction time, and L/S ratio.





4.5.3 Extraction effect on antioxidant capacity

Two different methods to assess antioxidant capacity (DPPH and FRAP) were used in this research. Assessment results are shown in Table 4-1. DPPH antioxidant activity evaluations for MAE extracts ranged from 103.71 to 432.88 $\mu\text{mol TE/g CPH}$. DPPH antioxidant activity values for conventional extraction were lower, ranging from 112.91 to 114.92 $\mu\text{mol TE/g CPH}$. FRAP values for MAE extraction oscillated from 77.18 to 127.44 $\mu\text{mol TE/g CPH}$, while conventional extraction values varied from 85.85 to 89.74 $\mu\text{mol TE/g CPH}$.

MAE extraction antioxidant capacity was mainly influenced by the positive linear effect of microwave power, as seen in the Pareto charts 4-1C and 4-1D. By increasing microwave power during MAE, there is also an increase in energy within solvent molecules, and this speeds up the contact process between the active substances and the solvent: therefore, the amount of obtained antioxidants during MAE is higher (Rahmawati et al., 2021). This behavior is in tune with what has been already found by Nguyen et al. (2021a), who studied different drying conditions (sun-drying, hot-air drying at 60, 80, and 100 °C, vacuum drying at 60, 80, and 100 °C, infrared drying at 35, 40, 45 °C, and microwave drying at 270, 450, and 720 W) over CPH phytochemical compound retention and antioxidant capacity. For

them, microwave drying at 720 W resulted in the shortest drying time and retained the highest level of TPC and antioxidant capacity.

Images from 4-2G to 4-2L show 3-D response surfaces for DPPH and FRAP, according to the adjusted models. These three-dimensional graphs represent the response as a function of two variables, while the third variable is fixed in a constant middle level. In general, both antioxidant extracting methods showed similar behavior for the response surface profiles. In images 4-2G, 4-2H, and 4-2I, it is possible to see the DPPH effect, while in images 4-2J, 4-2K, and 4-2L, it is possible to do so for FRAP. Values for dependent variables increased as a result of the increase in microwave power, reaching their maximum levels at 400 W, and for the L/S ratio corresponding to 70 mL/g. Extraction time also had a positive effect, but with less influence.

Considering the Box-Behnken Design explored, the highest values for both DPPH and FRAP were 432.88 $\mu\text{mol TE/g CPH}$ (108.34 mg TE/g CPH), and 127.44 $\mu\text{mol TE/g CPH}$ (31.89 mg TE/g CPH), respectively. These values (highest TPC) were obtained under the following operational conditions: 400 W, 70 mL/g, and 180 seconds. Nguyen et al. (2021b) suggested that phenolic compounds had an essential role in the antioxidant capacity of CPH extracts. Miranda et al. (2020), and Delgado-Ospina et al. (2021) reported DPPH values of 46.63 mg TE/g and 133 $\mu\text{mol TE/g}$, respectively, which were similar to the values found in this research, but on the lower levels of extraction. Nguyen et al. (2021b) reported DPPH values of 59.14 mg/g for CPH micro-encapsulated extracts. Other studies that used MAE were carried on by Nguyen et al. (2020), and they reported DPPH values of 136.89 mg TE/g when a microwave power was 600 W.

For FRAP, Delgado-Ospina et al. (2021) reported values of 77 $\mu\text{mol TE/g}$ for CPH values not subjected to thermal treatments, in the same way as in this study, with higher values when thermal treatments are considered (181 $\mu\text{mol TE/g}$). Yapo et al. (2013) analyzed antioxidant extraction by subjecting CPH to four different sequential treatments, in terms of solvent type, finding FRAP values of 129.5 $\mu\text{mol TE/g}$. These researchers concluded that the total antioxidant capacity seems to be linked to synergistic interactions among different compounds with antioxidant capacity. These compounds include soluble phenolic compounds, condensed tannins, and possibly peptides.

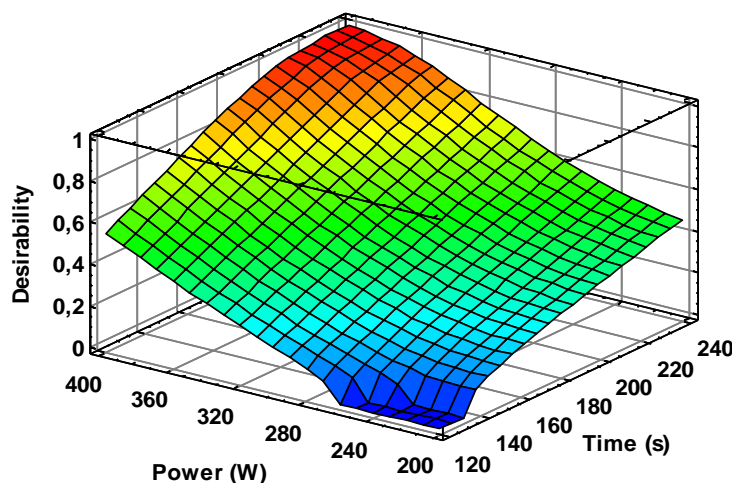
4.5.4 Microwave power optimal conditions

It is known that, during extraction processes, particle size, substance/solvent ratio, extraction time, and microwave power, are all factors that influence the final concentration of bioactive compounds obtained (Rahmawati et al., 2021). To extract the highest quantity of compounds of interest, it is necessary to optimize these parameters, since they are influential in the extraction process. In this research, the Box-Behnken Design used to find the best TPC and antioxidant capacity extraction conditions (considering microwave power, L/S ratio, and extraction time), revealed that sample number 12 (400 W, 180 seconds, and 70 mL/g) was the one with the best characteristics for the three variables taken into account (response variables).

Extraction factors were optimized using the response surface methodology (RSM). In this sense, the optimal conditions were: 394.44 W, 240 s, and 70 mL/g for TPC; 400 W, 240 s, and 69.55 mL/g for DPPH, and 400 W, 232.06 s, and 70 mL/g for FRAP. By using these optimized conditions, extract values are expected to be 43.52 mg GA/g CPH for TPC, 443.88 $\mu\text{mol TE/g CPH}$ for DPPH, and 144.61 $\mu\text{mol TE/g CPH}$ for FRAP.

A multiple-response optimization was carried out, considering previous optimal values for TPC, DPPH, and FRAP, and using a method based on the desirability, having in mind that this function allows combining the different levels for each factor that satisfy simultaneously all requirements for each response (Image 4-3). Therefore, the optimal final conditions were found to be 400 W, 240 seconds, and 67 mL/g, with a CPH extraction desirability factor of 0.89. These optimal conditions allowed us to obtain 43.94 mg GA/g CPH (TPC), 430.8 $\mu\text{mol TE/g CPH}$ (DPPH), and 144.32 $\mu\text{mol TE/g CPH}$ (FRAP).

Figure 4-3: Optimization multiple responses (400 W, 240 s and 67 mL/g), for extract CPH.



4.5.5 Model analysis

ANOVA was used to analyze the effect of the several factors on the selected responses. Table 4-2 shows the linear model effects, and p values associated with responses for EY, TPC, DPPH, and FRAP. F-test showed that only models linked to yield (EY) and phenolic compounds (TPC) were suitable (p value ≤ 0.05) to describe observed results with a confidence level of 95%, suggesting that the model can be suitable for the experimental results.

Table 4-2: ANOVA results for the assessment of factors' significance, based on F-test and p values for EY, TPC, DPPH, and FRAP, by MAE.

Extraction yield (EY)

Source	Sum of Square	D F	Mean Square	F-value	p -value	Significant
Model	133.241	9	14.8046	4.85	0.0247	Significant
A: Microwave power	9.83905	1	9.83905	2.09	0.2216	Not significant
B: Extraction time	7.45559	1	7.45559	1.59	0.2764	Not significant
C: L/S Ratio	81.5556	1	81.5556	17.34	0.0141	Significant
A x A	0.177941	1	0.177941	0.04	0.8552	Not significant
A x B	10.8636	1	10.8636	2.31	0.2031	Not significant
A x C	0.000004	1	0.000004	0.00	0.9993	Not significant
B x B	0.380655	1	0.380655	0.08	0.7901	Not significant
B x C	10.1347	1	10.1347	2.16	0.216	Not significant
C x C	12.8627	1	12.8627	2.74	0.1735	Not significant
Lack of fit	2.57793	3	0.859309	0.18	0.9029	Not significant

Pure error	18.8086	4	4.70215			
R2= 86.17						
Adjusted R2= 68.39						

Total phenolics content (TPC)

Source	Sum of Square	D F	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Model	470.994	8	58.8743	8.75	0.0030	Significant
A: Microwave power	178.794	1	178.794	93.1613	0.0006	Significant
B: Extraction time	93.1613	1	93.1613	48.8	0.0022	Significant
C: L/S Ratio	98.4204	1	98.4204	51.55	0.0020	Significant
A x A	24.9966	1	24.9966	13.09	0.0224	Significant
A x B	22.8006	1	22.8006	11.94	0.0259	Significant
A x C	15.8802	1	15.8802	8.32	0.0448	Significant
B x C	10.857	1	10.857	5.69	0.0756*	Not significant
C x C	28.9132	1	28.9132	15.14	0.0177	Significant
Lack of fit	46.1725	4	11.5431	6.05	0.0547*	Not significant
Pure error	7.63648	4	1.90912			
R2= 89.75						
Adjusted R2= 79.49						

DPPH

Source	Sum of Square	D F	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Model	83544.1	6	13924	11.78	0.0005	Significant
A: Microwave power	33365.9	1	33365.9	180.22	0.0002	Significant
B: Extraction time	15330.0	1	15330.0	82.8	0.0008	Significant
C: L/S Ratio	7970.16	1	7970.16	43.05	0.0028	Significant
A x A	16133.5	1	16133.5	87.14	0.0007	Significant
A x C	8016.52	1	8016.52	43.3	0.0028	Significant
B x C	2727.97	1	2727.97	14.73	0.0185	Significant
Lack of fit	11076.4	6	1846.07	9.97	0.0216	Significant
Pure error	740.553	4	185.138			
R2= 87.61						
Adjusted R2= 80.17						

FRAP

Source	Sum of Square	D F	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Model	2870.13	8	358.766	28.26	0.0000	Significant
A: Microwave power	818.91	1	818.91	259.19	0.0001	Significant
B: Extraction time	303.935	1	303.935	96.2	0.0006	Significant

C: L/S Ratio	575.114	1	575.114	182.03	0.0002	Significant
A x A	402.622	1	402.622	127.43	0.0004	Significant
A x B	51.2656	1	51.2656	16.23	0.0158	Significant
A x C	353.816	1	353.816	111.99	0.0005	Significant
B x C	297.045	1	297.045	94.02	0.0006	Significant
C x C	86.7344	1	86.7344	27.45	0.0063	Significant
Lack of fit	88.9354	4	22.2338	7.04	0.0426	Significant
Pure error	12.6379	4	3.15948			
R2= 96.58						
Adjusted R2= 93.16						

All R² coefficients for the models were high (EY: 0.8617, TPC: 0.8975, DPPH: 0.8761, and FRAP: 0.9658), indicating that mathematical models are suitable for the representation of experimental results, explaining satisfactorily the behavior of the extraction process. In addition, R² adjusted coefficients were also high (EY: 0.6839, TPC: 0.7949, DPPH: 0.8017, and FRAP: 0.9316), suggesting a high degree of correlation between predicted values and experimental data.

Mathematical models explaining the behavior of phenolic compounds and antioxidant capacities are shown next: A, B, and C correspond to microwave power, L/S ratio, and extraction time, for the MAE.

$$\text{EY} = 40.8107 - 0.0260405 \cdot A - 0.162701 \cdot B + 0.357687 \cdot C - 0.0000205575 \cdot A^2 + 0.000274667 \cdot AB + 5 \cdot E-7 \cdot AC + 0.0000835208 \cdot B^2 + 0.00132646 \cdot BC - 0.00436956 \cdot C^2$$

$$\text{TPC} = 47.9372 - 0.220152 \cdot A - 0.131146 \cdot B + 0.283586 \cdot C + 0.000243316 \cdot A^2 + 0.000397917 \cdot AB + 0.00099625 \cdot AC + 0.00137292 \cdot BC - 0.00654211 \cdot C^2$$

$$\text{DPPH} = 856.804 - 4.17655 \cdot A - 0.358542 \cdot B - 9.05419 \cdot C + 0.00617196 \cdot A^2 + 0.0223837 \cdot AC + 0.0217625 \cdot BC$$

$$\text{FRAP} = 252.358 - 0.827258 \cdot A - 0.435333 \cdot B - 1.14635 \cdot C + 0.000976513 \cdot A^2 + 0.000596667 \cdot AB + 0.0047025 \cdot AC + 0.00718125 \cdot BC - 0.0113309 \cdot C^2$$

4.5.6 CPH extract color

Colorimetric parameters obtained through the CIELAB system corresponded to luminosity (L*), green-red coordinates (a*), and blue-yellow coordinates (b*). Other parameters such as saturation (C) and hue angle (h*) were determined following the methodology developed by Delgado-Ospina et al. (2021). All data for color is presented in Table 4-3. Most of the

extracts have a negative value of a^* , which is an indication that these extracts are located in the CIELAB color-space second quadrant, except for certain samples extracted at a microwave power of 400 W situated in the first quadrant.

Comparing MAE and conventionally extracted samples, it is possible to observe that samples from conventional extraction are slightly more luminous, which can be indicative of pigment degradation and a lower amount of polyphenols (Soto Mora & Roa, 2021).

MAE-extracted samples with a L/S ratio corresponding to 70 mL/g had a higher hue angle and also higher color purity in comparison with the rest of the extracts. In other words, they have tones ranging from red to yellow, which cannot be considered purely yellow but have a more intense yellow-like tone in contrast with other extracts. This situation is observed for both extracting methods.

These results for extract color are opposed to the ones obtained when a microwave power of 400 W was used: lower hue angle and color purity, which indicates a loss of the intense yellow color, and a darkening of the extracts. In this sense, it is possible to conclude from these color results and TPC data that when TPC increases, CPH extract color tends to have lower values for L^* , and higher values of a^* and b^* .

Table 4-3: Color coordinates of CPH extracts.

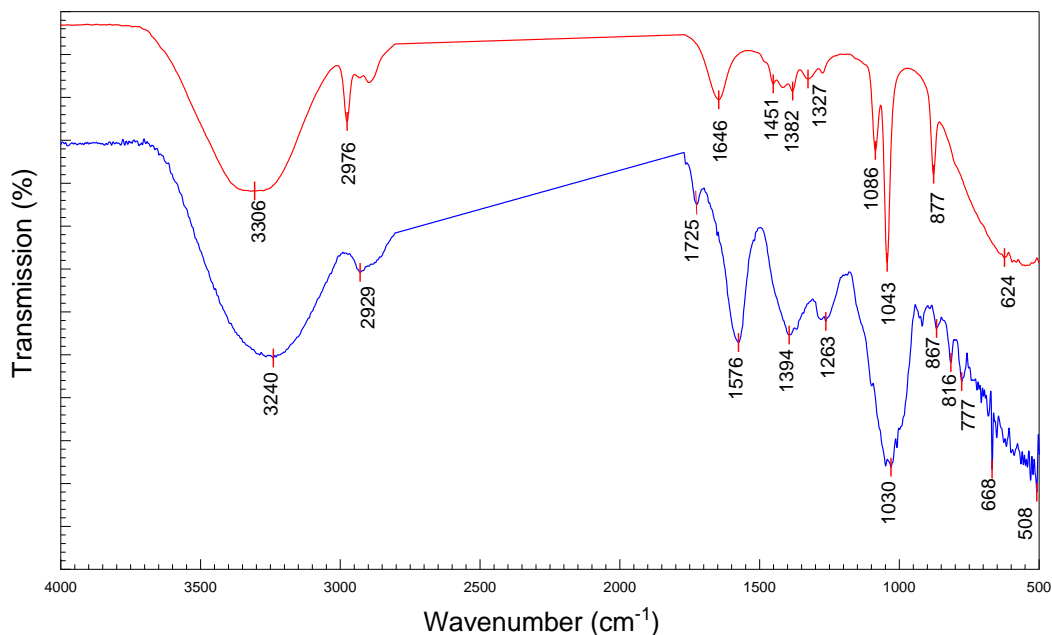
Assay	Microwave power (W)	Extraction time (s)	Liquid-to-solid ratio (mL/g)	L^*	a^*	b^*	C^*	h^*
1	200	240	50	95.92	-0.74	16.44	16.46	92.59
2	200	180	70	97.51	-0.73	10.72	10.71	94.58
3	400	180	30	88.96	1.58	32.03	32.07	87.18
4	200	180	30	93.67	-0.57	23.57	23.57	91.39
5	400	120	50	95.45	-0.56	17.29	17.3	91.86
6	200	120	50	96.92	-0.74	12.81	12.81	93.67
7	400	240	50	79.55	10.21	40.47	41.74	75.85
8	300	240	70	96	-0.47	14.69	14.69	91.84
9	300	240	30	92.43	-0.06	26.53	26.53	90.13
10	300	120	70	97.2	-0.67	11.57	11.57	93.73
11	300	120	30	93.95	-0.5	22.82	22.83	91.26
12	400	180	70	94.72	-0.05	16.9	16.9	90.18
13	300	180	50	95.38	-0.61	17.66	17.67	91.99
14	300	180	50	95.47	-0.63	17.28	17.29	92.09

Assay	Microwave power (W)	Extraction time (s)	Liquid-to-solid ratio (mL/g)	L*	a*	b*	C*	h*
15	300	180	50	95.53	-0.62	17.05	17.06	92.09
16	300	180	50	95.54	-0.6	16.96	16.97	92.03
17	300	180	50	95.66	-0.65	16.74	16.75	92.23
Control 1			70	97.6	-0.71	9.33	9.36	94.37
Control 2			50	97.01	-0.9	12.07	12.1	94.27
Control 3			30	95.71	-1.08	17.61	17.64	93.52

4.5.7 FTIR analysis

Image 4-4 shows the typical FTIR spectra for CPH extracts obtained by (1) MAE using optimal conditions (400 W, 240 s, and 67 mL/g) (in blue), and (2) conventional extraction (in red). Domínguez-Pérez et al. (2019) in their cacao research, reported that spectra could be associated as follows: (1) 2975 and 2897 cm^{-1} for CH_3 stretching vibration, (2) 1416 cm^{-1} for CH_3 bending vibration and COO^- stretching vibration, which can be a sign of polyphenols, (3) 1085 cm^{-1} for C-O ester stretching vibration, and (4) 1043 cm^{-1} for C-C, C-N, and C-O stretching vibrations. Additionally, catechin spectra could be associated as follows: (1) 831 cm^{-1} for C-H alkenes, (2) 1040 cm^{-1} for -C-O alcohols, (3) 1112 cm^{-1} for C-O-H alcohols, (4) 1144 cm^{-1} for aromatic alcohols, (5) 1285 cm^{-1} for C-O alcohols, (6) 1478 cm^{-1} for C-H alkanes, (7) 1512 cm^{-1} for C=C aromatic rings, and (8) 1611 cm^{-1} for C=C alkenes. Gallic acid showed absorption bands at 866 cm^{-1} , 1026 cm^{-1} , 1237 cm^{-1} , 1451 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} , and 1619 cm^{-1} .

Figure 4-4: CPH FTIR spectra: blue for the spectrum of extracts obtained by MAE using optimal conditions (400 W, 240 s, and 67 mL/g), and red for the spectrum of extracts obtained by conventional extraction.



Chun, Husseinsyah, and Osman (2014), and Fitri et al., (2021), reported similar values for the spectrophotometric bands: (1) 3306 cm^{-1} for O-H groups of hydroxyls of hemicellulose, cellulose, lignin, and moisture absorption, (2) 2930 cm^{-1} for C-H alkanes, (3) 1451 cm^{-1} for CH_2 cellulose deformations or CH lignin deformations, and (4) 1326 cm^{-1} for CH vibrations belonging to cellulose and lignin units. Bands close to 1726 cm^{-1} ($1760\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$) are linked to carbonyl functional groups (C=O) (Thu Dao et al., 2021). The band corresponding to 1635 cm^{-1} indicated C=C alkenes, or C=O amides, which can be associated with proteins and phenolic compounds (Lateef et al., 2016).

In general, there were no huge differences between both spectra. However, there is an increase in bands 1575 , 1394 , and 1263 cm^{-1} , for MAE extraction. These bands are related as follows: (1) 1575 cm^{-1} for COO^- vibration band in CPH spectra (Yong et al., 2018), which can be linked to catechin spectrum; (2) 1394 cm^{-1} for CH deformations in cellulose and hemicellulose (Chun, Husseinsyah y Yeng., 2014), which can be connected to proteins; and (3) 1263 cm^{-1} for CCO asymmetrical bending vibration, which is an O-H bending attributed to flavonoids (Domínguez-Pérez et al., 2019). This last vibration for OH is also reported by Hansen and Spanget-Larsen (2003): within 760 and 700 cm^{-1} bands, which correspond to phenolic compounds with intramolecular hydrogen bonds. The increase in these bands might be associated with the increase in TPC in CPH MAE extracts. Another

difference is observed in bands 675-870 cm^{-1} (C-H aromatic), where there are more peaks in the MAE extraction (Muharja et al., 2021).

4.6 Conclusions

CPH is a potential agro-industrial by-product: an excellent source for the extraction of phenolic and antioxidant compounds. MAE researched in this study represents an environmentally friendly and innovative alternative for a suitable valorization of this by-product. The obtained results support the fact that MAE is suitable for the recovery of high-phenolic and antioxidant-content extracts, which were obtained in a time-efficient way, using a minimal quantity of solvents, in contrast with conventional extraction methods. Microwave power was the most crucial factor to obtain the highest TPC and antioxidant capacity values. It is imperative to research more in terms of higher microwave power and extraction times, using CPH and MAE, to determine if these processing factors affect the molecular nature and phenolic compounds' integrity.

CRedit authorship contribution statement

Martha Cecilia Rincón-Soledad: Investigation, Formal analysis, Software, Writing - original draft. Carlos Eduardo Narvaez-Cuenca: Methodology, Investigation, Writing - review & editing, Supervision. Luis-Felipe Gutiérrez: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing, Supervision, Guillermo Balseiro translation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) of the Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá and Agrosavia. The authors thank to

all the staff of Agrosavia that collected and processed the cocoa fruits and for obtaining the by-products. Maria Cristina Lizarazo-Aparicio: Investigation, Formal analysis.

5. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa bean shell as valorization strategy

Martha Cecilia Rincón, Luis-Felipe Gutiérrez, Carlos Eduardo Narváez

En este capítulo escrito en forma de artículo científico se describen los resultados obtenidos para la cascarilla, en relación con el contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes por los métodos DPPH y FRAP.

5.1 Resumen

La cascarilla del grano de cacao (CBS) es un subproducto rico en compuestos bioactivos obtenidos en grandes cantidades en la producción de chocolate, actualmente es poco utilizada, este trabajo tiene como objetivo realizar una valorización estratégica para la extracción asistida por microondas (MAE) de CBS para la recuperación de compuestos bioactivos. En este trabajo se utilizó un Diseño Box-Behnken con metodología de superficie de respuesta y se seleccionaron las condiciones del proceso a partir de una combinación de factores para optimizar la extracción, los factores evaluadores fueron potencia de microondas, tiempo de extracción y relación solvente/sólido L/S, y las variables respuesta seleccionadas fueron rendimiento (EY), contenido de fenoles totales (TPC) y capacidad antioxidante total para dos métodos (DPPH, FRAP). El principal factor que influyó en EY, TPC y FRAP fue el tiempo de extracción, para DPPH influyó la potencia de microondas. El extracto obtenido en las condiciones óptimas (399.88 W; 217.42 segundos y relación L/S de 69.71 mL/g) presentó 21.62% de rendimiento, (45.68 mg equivalentes de ácido gálico/g d.w.) de TPC, la capacidad antioxidante para FRAP y DPPH fue respectivamente de 165.05 μmol equivalentes Trolox (TE)/g CBS y 341.67 μmol equivalentes Trolox (TE)/g CBS. Los resultados de este estudio indican que CBS puede considerarse una buena fuente de compuestos fenólicos con una importante actividad antioxidante.

5.2 Abstract

Cacao bean shell (CBS) is a waste by-product that is obtained in great amounts during chocolate production. This bioactive-compound-rich by-product is currently under-exploited; therefore, this research aims to allow its strategical valorization through a microwave-assisted extraction process (MAE). A Box-Behnken Design (BBD) along with a response surface methodology (RSM) were used in this research. The processing conditions were selected considering three factors: (1) microwave power, (2) extraction time, and (3) liquid/solid ratio (L/S); such factors allowed to make microwave-assisted extraction (MAE) optimal. The selected response variables were (1) extraction yield (EY), (2) total phenolic content (TPC), and total antioxidant capacity (TAC, represented by DPPH, and FRAP). The most influential factor over EY, TPC, and FRAP was the extraction time, while for DPPH, this factor corresponded to microwave power. The extract obtained in the optimal conditions (microwave power of 399.88 W, 217.42 seconds of extraction time, and L/S ratio of 69.71 mL/g) had a yield of total phenolic compounds of 21.62% (45.68 mg gallic acid/g DW), and TAC of 165.05 $\mu\text{mol Trolox (TE)/ g CBS}$ for FRAP, and 341.67 $\mu\text{mol Trolox (TE)/ g CBS}$ for DPPH, respectively. The findings of this research indicate that CBS can be considered a suitable source of phenolic compounds with an important antioxidant capacity.

5.3 Introduction

During cocoa beans processing, the most important waste by-product is its shell or outer tegument (known as cacao bean shell, or CBS). Worldwide CBS production is estimated to be around 900,000 tones (Botella-Martínez et al., 2021). Currently, this by-product is discarded, which means a valuable opportunity for valorization, especially considering its recent surge in interest due to its high phytochemical content (Cinar et al., 2021).

CBS contains hundreds of natural compounds, and among them, many show cytotoxic, antioxidant, antifungal, and antibacterial properties, which could potentially be taken advantage of as functional ingredients for human health. In this sense, many authors have reported such benefits. Cuéllar et al. (2012) found that CBS-derived compounds had promising antibacterial properties against *Bacillus cereus* and *Streptococcus agalactiae*. Rojo-Poveda et al. (2019a) also reported antibacterial activity against *Streptococcus mutans*; while Cinar et al. (2021) assessed different CBS extracts (using acetone, ethanol,

methanol, and water as solvents) against *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella spp*, and *B. cereus*: CBS acetone-extract was the one with the highest antimicrobial activity against *E. coli*, while the rest only had a weak antibacterial activity.

In addition to its promising antimicrobial properties, CBS is also of interest because of its bioactive compounds, such as methylxanthines and polyphenolic compounds (Botella-Martínez et al., 2021). Polyphenols are commonly identified as nutraceutical components: non-nutritional microconstituents regularly used in functional food formulas providing them with special features such as antioxidant activity, antidiabetic, and anticarcinogenic properties, among others (Rojo-Poveda et al., 2020a). In the specific case of CBS content of dietary fiber, some studies have reported that its antidiabetic properties might be linked to its glucose absorption capacity, which could potentially reduce sugar metabolism (Rojo-Poveda et al., 2020a).

Interestingly, it has been found that CBS is a food ingredient with a similar nutritional composition compared to cocoa nibs, except for the fat content, which is mostly substituted by fiber (Rojo-Poveda et al., 2020b). However, certain polyphenolic compounds, such as protocatechuic acid (PCA), have been found in higher concentrations in CBS than in cocoa powder (Rojo-Poveda et al., 2021). The concentration of these varied compounds is highly dependent on different processing factors, such as particle size, high temperatures (Sládková et al., 2016), fermentation (Jakovljevic et al., 2019), and the type of extraction (like MAE). In terms of MAE, this extraction method is also influenced by a variety of subfactors such as microwave frequency and power, microwave radiation exposure time, initial moisture content, particle size, solid/liquid ratio, solvent type and composition, temperature, pressure, and the number of extraction cycles (Sládková et al., 2016).

Because of its nutritional value and content of bioactive compounds, CBS has the potential to become an attractive source with a wide range of use in functional and pharmaceutical products (Jakovljevic et al., 2019). In this respect, it is essential to determine the characteristics associated with cacao variety TSC01 and, therefore, this research assessed MAE to research the influence of microwave power, liquid/solid ratio, and extraction time on CBS extraction yield, total phenolic content, and antioxidant content.

5.4 Methods and materials

5.4.1 Sample preparation

Cacao variety TCS01 from Nariño state (Colombia) was used as a raw source for this research. This cacao variety was harvested, and cocoa beans were extracted, fermented, and dried at room temperature. CBS was removed manually from cocoa beans. CBS samples were then ground into fine flour, and only fractions that were able to be sieved by a 100 µm sieve were used for chemical characterization.

Samples were then collected, packed, and stored at -40 °C until further use.

5.4.2 Reagents

Pure absolute ethanol (PanReac AppliChem) and distilled water were used as solvents. Methanol (>99.9%), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylhydrate (DPPH, 99%), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl chroman-2-carboxylic acid (Trolox, ≥97%), and total phenol content determination reagent Folin-Ciocalteu (2N) were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine, sodium acetate trihydrate (≥99,5%), iron (III) chloride hexahydrate, and gallic acid (>98%) were provided by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). For UHPLC analyses, ACN and ultrapure water were used and provided through a Milli-Q device (Millipore, Milford, MA, USA).

5.4.3 Conventional extraction

Each sample was mixed with 20 mL of 63% ethanol solution and then stirred for 20 minutes at room temperature and centrifuged at 3500 rpm for 15 minutes at 25 °C. Then, the sample was filtered (separating the supernatant liquid) with a PTFE 0.45 µm filter, and the resulting sediment biomass was subjected to another extraction using the same 63% ethanol solution volume: this process was repeated four times. All the obtained extraction solutions were mixed, and ethanol was added until completing a 100 mL volume. This extract was stored in the dark at -40 °C until it was time for further analyses. This extraction process was done for three CBS samples, differing in weight (control 1: 1.0008 g, control 2: 1.4007 g, and control 3: 2.3355 g). All extracts were stored in the dark at -40 °C. Lastly, dry extract was used for HPLC analyses.

5.4.4 MAE optimization

The MAE process for CBS was carried out with an ETHOS X (Milestone, Shelton, CT, USA) microwave system. Extractions were performed inside Teflon-enclosed containers with magnetic stirring (70 mL), using an ethanol-water solution (63% v/v) as a solvent. Following previous studies (Tamrin Faradilla et al., 2020; Sánchez-Reinoso et al., 2020), this is the most common solvent used for CBS extraction processes. Extraction conditions depended on three factors: (1) microwave power (200, 300, and 400 W), (2) extraction time (120, 180, and 240 seconds), and (3) liquid/solid ratio (30, 50, and 70 mL/g). These factors were manipulated as presented in the experimental design in Table 5-1.

After extraction, the enclosed containers were cooled down using ice for 15 minutes. Then, the obtained extracts were vacuumed filtered (filter paper Whatman®, UK), and were subsequently diluted in a volumetric flask until reaching a 100 mL volume using the same extraction solvent. Finally, extracts were stored in the dark at -40 °C, until it was time for further analyses.

5.4.5 Extraction yield

From each obtained extract (MAE and conventional extraction methods), a known aliquot was weighed, and the solvent was completely removed by an oven-drying process at 80 °C. In this way, the extraction yield (EY) was gravimetrically determined, reporting the results in weight percentage.

5.4.6 Determination of total phenolics content

TPC was spectrophotometrically assessed following a slightly modified Folin-Ciocalteu method. The calibration curve was carried out using gallic acid (0.031-1 mg/mL, $R^2 = 0.9984$). 10 μ L of each extract, 600 μ L distilled water, and 50 μ L non-diluted Folin-Ciocalteu reagent (2N), were mixed and stirred for one minute. After stirring, the mix was allowed to rest for two minutes, and then 150 μ L 20% (W/V) sodium carbonate and 190 μ L distilled water were added. After two hours of reactions, absorbance at 760 nm was measured by a spectrophotometer UV-vis V-530 (JASCO Corp., Tokyo, Japan). Every single

assessment was performed three times, and results were reported as gallic acid (GA) mg by sample dry weight (g) (mg GA/g DW CBS).

5.4.7 Determination of the antioxidant activity

- **DPPH radical scavenging activity**

The radical scavenging activity of the CBS extracts was measured in vitro using a purple methanol DPPH solution (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The assessing solution was obtained by dissolving DPPH (3 mg) with methanol (80 mL) and stirring the mix for 30 minutes. 1950 μ L assessing solution was vigorously mixed with 50 μ L extract aliquot, and let rest at room temperature for an hour, in the dark. Absorbance at 517 nm was measured by a spectrophotometer UV-vis V-530 (JASCO Corp., Tokyo, Japan). Methanol was used as a blank sample. Trolox (Sigma Aldrich, USA) was used as a standard curve (0.15-1 mM). Every single assessment was performed three times, and results were reported as μ mol Trolox by CBS (g) (μ mol TE/g CBS).

- **Ferric-reducing antioxidant power assay (FRAP)**

This assay quantified the reducing agent power of CBS samples to turn a ferric complex into ferrous, causing a blue coloration in the solutions where the reaction takes place. Blue coloration intensity is proportional to absorbance measured at 593 nm by a spectrophotometer UV-vis V-530 (JASCO Corp., Tokyo, Japan). For the FRAP assay, a modified methodology based on the one developed by Yapo et al. (2013) was followed. First, a FRAP stock solution was prepared by mixing (1) 300 mM acetate buffer (3.1 g CH₃COONa and 16 mL CH₃COOH) (pH 3.6), (2) TPTZ solution (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine), and (3) 20 mM FeCl₃ solution. This assessing solution had a ratio of 10:1:1 (acetate buffer: TPTZ: FeCl₃). After the stock solution was prepared, the following steps were performed: (1) 20 μ L CBS extract was mixed with 450 μ L assessing FRAP solution, and 735 μ L distilled water in a disposable micro cell, (2) after resting the mix for 30 minutes in the dark, absorbance was measured, and (3) results were calculated based on a Trolox standard calibration curve (between 0.0625 and 1 mM). Every single assessment was performed three times, and results were reported as μ mol TE by CPH (g).

5.4.8 Extract colors

Extract colors were measured by a Minolta CM-5 spectrophotometer (Konica Minolta, Tokyo, Japan), using a D65 illuminant, and 10° as vision angle. Registered CIELAB coordinates were calculated through L* values (100 = luminosity, 0 = darkness), a* color coordinates (red/green), and b* color coordinates (yellow/blue). Both a* and b* coordinates ranged from 100 to +100. Parameters for chroma (cab*) and hue (hab*) were calculated following what was established by Delgado-Ospina et al. (2021).

5.4.9 High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses

Prepared extracts were subjected to HPLC assessments through a reversed-phase ultra-high-performance liquid chromatography (RP-UHPLC) coupled to diode array detection (DAD), known as RP-UHPLC-DAD. An ultra-high-performance liquid chromatograph Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA), equipped with a pump, automatic sampler, and diode array detection, was used for the assessments. The chromatographic methodology followed was based on previous literature reports (Sánchez-Patán et al., 2011). Prepared extracts (5 µL) were introduced to a chromatographic column BEH AQUITY UPLC RP18 (150 mm × 2.1 mm, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, USA), at a temperature of 30 °C. Chromatographic columns were previously attached to a pre-column (5 mm × 2.1 mm, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, USA). The two used eluents were (1) water/acetic acid (98:2, v/v) (eluent A), and (2) acetonitrile/acetic acid (98:2, v/v) (eluent B). Elution was carried out adhering to a gradient program as follows: (1) start with isocratic conditions with 0.1% eluent B for 1.5 minutes, (2) linear gradient from 1.5 to 11.17 minutes, from 0.1 to 16.3% eluent B, (3) linear gradient from 11.17 to 11.5 minutes, from 16.3 to 18.4% eluent B, (4) isocratic conditions from 11.5 to 14.0 minutes with 18.4% eluent B, (5) linear gradient from 14.0 to 14.1 minutes, from 18.4 to 99.9% eluent B, (6) the isocratic conditions from 14.1 to 15.5 minutes with 99.9% eluent B, (7) linear gradient from 15.5 to 15.6 minutes, from 99.9 to 0.1% eluent B, (8) isocratic conditions from 15.6 to 18 minutes, with 0.1% eluent B and with a 400 µL/min flow. Device management and data processing were carried out with Chromeleon v. 7.1.2. (Dionex, Sunnyvale, CA, USA).

Identification was based on UV spectra and the comparison between retention times and UV spectra with authentic standards. A chromatographic band was registered at 290 nm, and peaks with an area above 1% were considered.

5.4.10 Experimental design and statistical analysis

A Box-Behnken Design (BBD) was used considering three numerical factors for three levels: (1) microwave power (200, 300, and 400 W), (2) extraction time (120, 180, and 240 seconds), and L/S ratio (30, 50, and 70 mL/g). This design allowed the optimization of the effects of the three extraction operational variables (TPC and CBS antioxidant activity, in terms of DPPH and FRAP). The Bok-Behnken Design was composed of 12 assessments, replicating five times in the central point, as shown in Table 5-1. These assessments were programmed and optimized by Design Expert software (10.0.6 version, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA).

Data analyses were carried out with STATGRAPHICS 18. Results are reported as means, with standard deviations for every three measurements. An ANOVA analysis was equally performed.

5.5 Results and discussion

5.5.1 Extraction effect on extraction yield

Table 5-1 shows the extraction yields for CBS extraction. Values ranged from 11.66 to 21.60% for MAE extraction. When samples were subjected to this extraction method at the highest microwave power and extraction time (400 W and 240 seconds), yield increased. However, the trend for extraction yield was decreasing when the extraction time was reduced to 120 seconds. These results were confirmed by the statistical analysis (Table 5-2), which demonstrated that time and microwave power had a significant influence on the CBS extraction yield. On the other hand, the linear effect linked to the L/S ratio did not have any statistically significant influence on EY.

Table 5-1: Experimental conditions and results for CBS MAE optimization.

Assay	Microwave power (W)	Extraction time (s)	Liquid-to-solid ratio (mL/g)	Extraction yield (EY) (%)	TPC (mg GA/g CBS)	DPPH ($\mu\text{mol TE/g CBS}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE/g CBS}$)
1	200(-1)	240(1)	50(0)	16.64	37.16 \pm 0.89	190.41 \pm 0.54	124.65 \pm 8.34

Capítulo 5. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa bean shell as valorization strategy

Assay	Microwave power (W)	Extraction time (s)	Liquid-to-solid ratio (mL/g)	Extraction yield (EY) (%)	TPC (mg GA/g CBS)	DPPH ($\mu\text{mol TE/g CBS}$)	FRAP ($\mu\text{mol TE/g CBS}$)
2	200(-1)	180(0)	70(1)	16.26	41.52 + 0.36	224.27 + 16.02	153.32 + 4.07
3	400(1)	180(0)	30(-1)	19.20	41.86 + 0.71	265.26 + 9.6	152.35 + 2.14
4	200(-1)	180(0)	30(-1)	13.93	31.56 + 1.63	177.57 + 3.26	108.57 + 9.12
5	400(1)	120(-1)	50(0)	17.01	39.44 + 1.47	316.74 + 7.18	130.78 + 7.58
6	200(-1)	120(-1)	50(0)	11.66	25.66 + 2.69	182.09 + 4.13	88.69 + 5.01
7	400(1)	240(1)	50(0)	21.60	43.46 + 3.84	334.10 + 9.96	134.17 + 7.20
8	300(0)	240(1)	70(1)	19.13	42.59 + 1.50	292.71 + 5.35	158.81 + 10.57
9	300(0)	240(1)	30(-1)	17.55	40.23 + 0.35	215.70 + 7.06	132.77 + 5.74
10	300(0)	120(-1)	70(1)	13.27	31.67 + 2.78	209.73 + 1.32	108.95 + 7.94
11	300(0)	120(-1)	30(-1)	12.39	23.76 + 2.35	153.20 + 6.58	78.54 + 4.97
12	400(1)	180(0)	70(1)	20.37	45.56 + 0.64	317.71 + 6.26	164.81 + 15.50
13	300(0)	180(0)	50(0)	17.69	35.34 + 1.09	255.06 + 5.33	121.77 + 7.47
14	300(0)	180(0)	50(0)	17.40	37.32 + 1.62	252.28 + 4.8	119.49 + 9.87
15	300(0)	180(0)	50(0)	16.72	40.54 + 2.48	249.97 + 10.98	123.38 + 4.99
16	300(0)	180(0)	50(0)	15.52	37.22 + 2.28	238.91 + 18.48	115.86 + 1.14
17	300(0)	180(0)	50(0)	16.93	41.66 + 1.85	256.06 + 3.93	116.70 + 4.85
Control 1			70	12.47	26.14 + 2.05	143.32 + 5.43	131.21 + 6.56
Control 2			50	13.76	25.60 + 1.18	159.27 + 18.16	126.97 + 2.22
Control 3			30	13.33	25.89 + 0.48	129.69 + 5.98	123.25 + 6.14

In general, MAE had higher extraction yields in contrast with the conventional extraction: control 1 (12.47%), control 2 (13.76%), and control 4 (13.33%). These values are also higher if compared with the ones obtained by Utami et al. (2017), who evaluated the effect of different roasting degrees for cocoa on extraction yields. These authors reported that CBS polyphenol extracts with a high roasting degree had a low yield (8.07%); while when a medium roasting process was applied, then the yield was the highest: higher roasting degree, lower yield. This can be explained due to phenolic compound degradation when subjected to high temperatures (Alonso-Salces et al., 2001).

The highest extraction yield corresponding to 21.6% was obtained when microwave power was 400 W, extraction time was 240 seconds, and the L/S ratio was 50 mL/g. When time increased from 120 to 240 seconds, yield increased significantly from 17.01 to 21.6%, using the same microwave power and L/S ratio. These results show that extraction yield is directly proportional to the extraction time.

Finally, in terms of extraction times, MAE allowed obtaining higher extraction yields in reduced periods, in comparison with the conventional extraction. This might be explained by the fact that MAE quickly increases temperature, and this has a positive effect on the yield which is higher in a shorter time. Another important factor to take into consideration is

particle size. This factor is linked to mass transfer kinetics, as well as to solvent access, making permeability and diffusivity easier, and these two last aspects are essential in extraction efficiency (Botella-Martínez et al., 2021).

5.5.2 Extraction effect on total phenolic content

CBS total phenolic content by MAE, expressed in gallic acid equivalent units, ranged from 23.76 to 45.56 mg GA/g DW, while when extraction was performed conventionally, TPC values were lower, ranging from 25.6 to 26.14 mg GA/g DW. It is possible to relate these lower values to a lower selectivity linked to the conventional technique, in contrast with MAE. This lower selectivity hinders conventional extraction efficiency in terms of bioactive compound extraction (Valadez-Carmona et al., 2018).

However, TPC values associated with conventional extraction were considerably higher or similar to the ones reported by Utami et al. (2007), Rojo-Poveda et al. (2019b), Soto (2012), Yapo et al. (2013), Utami et al. (2021). Now, with respect of extraction values with MAE, Ordóñez et al. (2019) and Mellinas et al. (2020) informed of similar values, but using different extraction techniques. Mellinas et al. (2019) reported values of 23.2 mg GA/g, using as conditions 500 W microwave power, 5 minutes extraction time, and 100 °C temperature. In 2020, Mellinas et al. reported values ranging from 5.5. to 28.9 mg GA/g, but changing other factors such a pH, extraction time, temperature, and S/L ratio. Compared to what was obtained by Contreras (2016) (47.65 mg GA/g), the results in this research were lower. This situation is the same when comparing our results to the ones obtained by Barbosa-Pereira et al. (2018): these researchers evaluated samples considering variables such as their origin, cacao variety, and industrial processing, and their TPC values ranged from 16.82 to 54.19 mg GA/g (CBS bioactive compound contents were highly correlated to these variables).

Table 5-2: ANOVA results for the assessment of MAE extraction factors' significance, based on F-test and *p* values.

Extraction yield (EY)						
Source	Sum of Square	DF	Mean Square	F-value	<i>p</i> -value	Significant
Model	113.671	9	12.6301	26.63	0.0001	Significant

Capítulo 5. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa bean shell as valorization strategy

A: Microwave power	48.531	1	48.531	69.12	0.0011	Significant
B: Extraction time	52.9987	1	52.9987	75.48	0.001	Significant
C: L/S Ratio	4.40006	1	4.40006	6.27	0.0665	Not significant
A x A	3.15607	1	3.15607	4.49	0.1013	Not significant
A x B	0.038416	1	0.038416	0.05	0.8265	Not significant
A x C	0.334084	1	0.334084	0.48	0.5283	Not significant
B x B	4.10987	1	4.10987	5.85	0.0728	Not significant
B x C	0.12215	1	0.12215	0.17	0.698	Not significant
C x C	0.323011	1	0.323011	0.46	0.5348	Not significant
Lack of fit	0.511193	3	0.170398	0.24	0.8629	Not significant
Pure error	2.80859	4	0.702148			
R2= 97.16						
Adjusted R2= 93.514						

Total phenolics content (TPC)

Source	Sum of Square	DF	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Model	552.116	9	61.3462	8.54	0.0050	Significant
A: Microwave power	148.092	1	148.092	21.84	0.0095	Significant
B: Extraction time	230.159	1	230.159	33.94	0.0043	Significant
C: L/S Ratio	71.5806	1	71.5806	10.55	0.0314	Significant
A x A	13.4646	1	13.4646	1.99	0.2316	Not significant
A x B	13.9876	1	13.9876	2.06	0.2243	Not significant
A x C	9.7969	1	9.7969	1.44	0.2957	Not significant
B x B	59.9788	1	59.9788	8.84	0.041	Significant
B x C	7.70062	1	7.70062	1.14	0.3467	Not significant
C x C	0.026445	1	0.0264445	0	0.9532	Not significant
Lack of fit	23.1671	3	7.72236	1.14	0.4345	Not significant
Pure error	27.1283	4	6.78208			
R2= 91.65						
Adjusted R2= 80.92						

DPPH

Source	Sum of Square	DF	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Model	40330.1	6	6721.69	19.51	0.0001	Significant
A: Microwave power	26389.1	1	26389.1	557.1	0.0000	Significant
B: Extraction time	3662.0	1	3662.0	77.31	0.0009	Significant
C: L/S Ratio	6768.08	1	6768.08	142.88	0.0003	Significant
A x A	1198.76	1	1198.76	25.31	0.0073	Significant
B x B	556.285	1	556.285	11.74	0.0266	Significant

C x C	1879.32	1	1879.32	39.67	0.0032	Significant
Lack of fit	3256.62	6	542.769	11.46	0.0168	Significant
Pure error	189.475	4	47.3687			
R2= 92.13						
Adjusted R2=87.40						

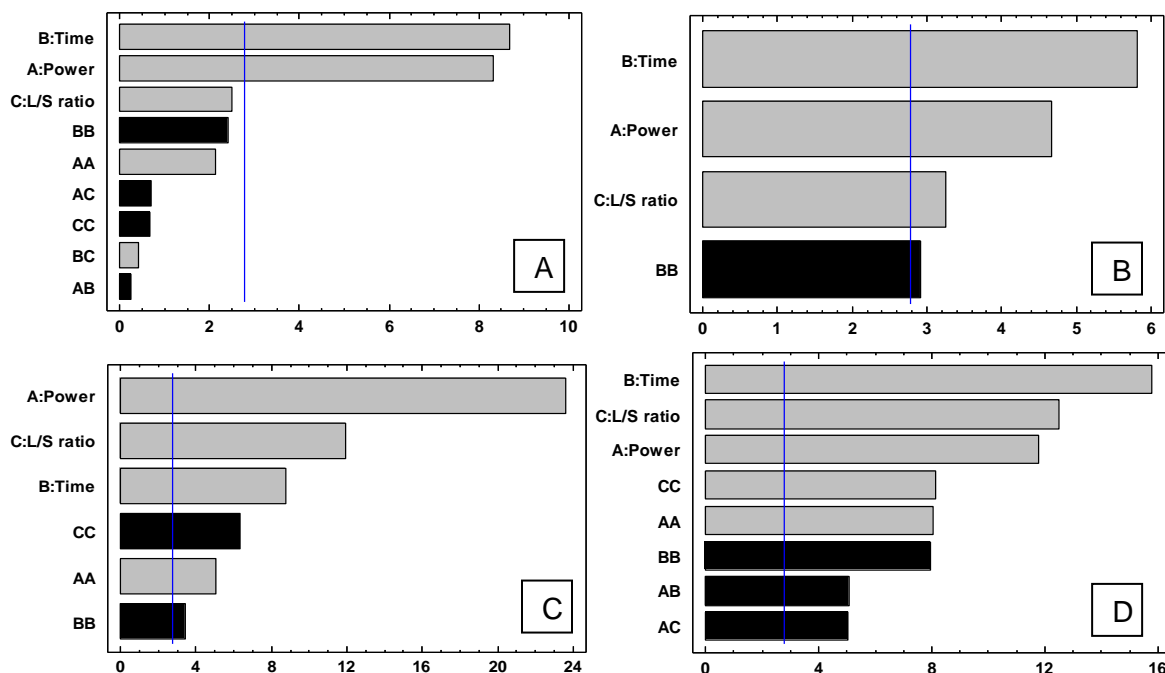
FRAP

Source	Sum of Square	DF	Mean Square	F-value	p-value	Significant
Model	8080.26	8	1010.03	14.13	0.0006	Significant
A: Microwave power	1427.92	1	1427.92	138.37	0.0003	Significant
B: Extraction time	2571.88	1	2571.88	249.22	0.0001	Significant
C: L/S Ratio	1614.82	1	1614.82	156.48	0.0002	Significant
A x A	664.622	1	664.622	64.4	0.0013	Significant
A x B	265.201	1	265.201	25.7	0.0071	Significant
A x C	260.661	1	260.661	25.26	0.0074	Significant
B x B	650.678	1	650.678	63.05	0.0014	Significant
C x C	685.413	1	685.413	66.42	0.0012	Significant
Lack of fit	530.429	4	132.607	12.85	0.0149	Significant
Pure error	41.279	4	10.3197			
R2=93.39						
Adjusted R2= 86.78						

MAE total phenolic contents were mostly affected by the positive linear effect of the three considered factors: extraction time, microwave power, and L/S ratio, as shown in Image 5-1B (Pareto charts). In this image, the highest values found were linked to a microwave power of 400 W, an extraction time of 180 seconds, and an L/S ratio of 70 mL/g. Having in mind the statistical analysis (Table 5-2), all variables have a significant difference in CBS phenolic extraction, however, extraction time was the one with the highest favorable effect, but only when extraction time was 180 seconds. When extraction time increased to 240 seconds, total phenolic contents were lower. The effect of extraction time and microwave power had a similar trend compared to the behavior observed for extraction yield.

Figure 5-1: Standardized Pareto Charts for the response variables A) Extraction yield (EY) B) total phenolics content (TPC) C) DPPH radical scavenging activity, and D) ferric-reducing antioxidant power (FRAP).

Capítulo 5. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa bean shell as valorization strategy



The extensive variability observed in the image might be linked to different factors: cacao variety, geographical origin, cacao genotype, farming conditions, and harvesting time (Rojo-Poveda et al., 2020b; Dos Anjos Lopes et al., 2021). This fact has been confirmed by Rojo-Poveda et al. (2021), who studied different CBS samples in order to differentiate them in terms of geographical origin and cacao variety. Their findings revealed a high variability related to differences in geographical origin (and therefore farming conditions and climate) but not as much as to cacao varieties. Botella-Martínez et al. (2021) stated that TPC values are mostly influenced by fermentation (and its time, pH, and temperature conditions): during this specific part of the processing, phenolic compounds move from cacao cotyledons to the shell. Additionally, they found that an increase in roasting temperatures affects TPC concentration: CBS polyphenol extracts from high roasting conditions usually present a lower extraction yield, while CBS polyphenol extracts from medium roasting conditions have the highest TPC contents (Utami et al., 2017). In this way, it is clear that TPC values highly depend on cacao fermentation times and conditions (Rojo-Poveda et al., 2021).

5.5.3 Extraction effect on antioxidant capacity

Antioxidant capacity for CBS MAE extracts was assessed by two methods: for FRAP, the antioxidant capacity values ranged from 78.54 to 164.81 $\mu\text{mol TE/g CBS}$; while for DPPH, the antioxidant capacity values ranged from 153.2 to 334.1 $\mu\text{mol TE/g CBS}$. The same methods revealed lower numbers for the conventional extraction: from 123.25 to 131.21 $\mu\text{mol TE/g CBS}$ (FRAP), and from 129.69 to 159.27 $\mu\text{mol TE/g CBS}$ (DPPH).

There is a correlation between antioxidant capacity and total phenolic content: a higher TPC corresponds to a higher antioxidant capacity (Lemborg et al., 2021). This correlation has been confirmed in this research: when extraction conditions are 400 W, 70 mL/g, and 180 s, TPC, FRAP, and DPPH values were the highest (45.56 mg GA/g CBS, 164.81 $\mu\text{mol TE/g CBS}$, and 334.10 $\mu\text{mol TE/g CBS}$, respectively). However, for the specific case of DPPH, the highest values were linked to 400 W, 50 mL/g, and 240 s, which suggests that antioxidant properties measured by reducing mechanisms are mostly linked to polyphenols (Agudelo et al., 2021).

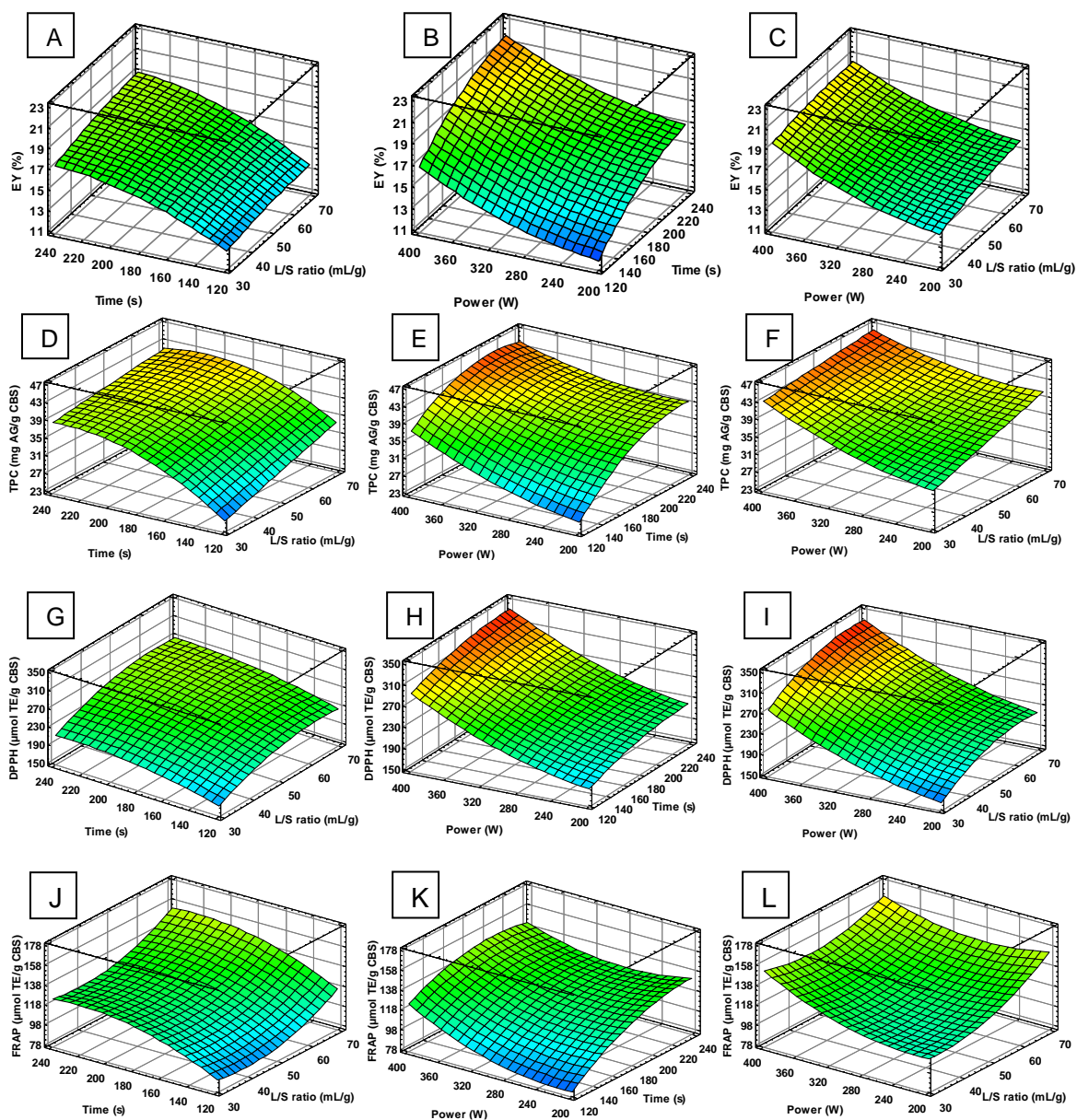
Antioxidant capacity (FRAP and DPPH) when MAE takes place was influenced by different variables, as shown in Pareto charts 5-1C and 5-1D. Now, even though all three variables have a positive linear influence in both antioxidant methods, FRAP was mostly influenced by extraction time, while DPPH was so for microwave power. Images 5-2J, 5-2K, and 5-2L show 3-D response surfaces for FRAP, in terms of two variables, while the third variable is fixed in a constant middle level. Values rise with the increase in extraction time, which is also linked to a more intense yellow coloration when the L/S ratio increases.

Response surfaces for DPPH are shown in Images 5-2G, 5-2H, and 5-2I: when the L/S ratio is low, changes in microwave power do not influence DPPH antioxidant capacity. However, when the L/S ratio is higher, DPPH increased dramatically with microwave power increases. When microwave power passed from 200 to 400 W, DPPH values also significantly grew from 182.09 to 316.54 mg GA/g CBS, while both the extraction time and L/S ratio remained constant (120 seconds and 50 mL/g). This situation might be linked to how microwave energy causes instantaneous heating of the extraction medium: this sudden temperature rise is essential in improving extraction because higher temperatures help to weaken cellular wall compounds, or even alters cell structure itself, which, at the same time, represents a higher phenolic compounds migration to the solvent. Moreover,

Capítulo 5. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa bean shell as valorization strategy

phenolic compounds' solubility speeds up with higher temperatures and, as a consequence, it is possible to reach a solubility equilibrium in a shorter time, which is critical to avoid or limit phenolic compounds' degradation during the extraction due to high temperatures (Xu et al., 2017 taken from Mellinas et al., 2020).

Figure 5-2: Response surfaces plots for EY, TPC, DPPH and FRAP as a function of microwave power, extraction time, and L/S ratio.



This research found FRAP and DPPH values higher than the ones reported by Martínez et al. (2012), Botella-Martínez et al. (2021), and Siow et al. (2022). However, FRAP values are similar to the ones reported by Lecumberri et al. (2007) (72.32 $\mu\text{mol TE/g CBS}$), Yapo et al. (2013) (83.46 $\mu\text{mol TE/g CBS}$), Delgado-Ospina et al. (2021) (106 $\mu\text{mol TE/g CBS}$), and Agudelo et al. (2021) (125 $\mu\text{mol TE/g CBS}$, by ultrasound extraction). For DPPH, Barbosa-Pereira et al. (2021) (90.89-317.31 $\mu\text{mol TE/g CBS}$) and Grillo et al. (2019) (189.4-235.3 $\mu\text{mol TE/g CBS}$) found values similar to the ones obtained in this research (129.69-334.1 $\mu\text{mol TE/g CBS}$). Other studies reported higher values: for DPPH and FRAP, Grillo et al. (2019) did so, while for FRAP, Sangronis et al. (2014), Soto (2012), and Contreras (2016) are in this group. Mellinas et al. (2019), performed MAE and obtained values corresponding to 49.54 $\mu\text{mol TE/g CBS}$ with the following conditions: 500 W, 5 minutes, and 100 °C. Their values were lower than the ones found in this research. However, further studies by the same authors (Mellinas et al., 2020) reported higher values (197.93 $\mu\text{mol TE/g CBS}$), changing extraction conditions (5 min, pH 12, 85 °C, and L/S ratio 0.04 mL/g).

Cacao and its by-products' antioxidant properties might be connected to a higher content in bioactive compounds present in their composition, especially flavan-3-ols (catechin and epicatechin), and methylxanthines (theobromine and caffeine) (Botella-Martínez et al., 2021). These properties, however, are influenced by other factors, for example, particle size: the matrix size reduction during milling/grinding can potentially produce a higher release of bioactive compounds, and therefore, an increase in antioxidant effect (Botella-Martínez et al., 2021). Dang and Nguyen (2019) assessed how different cacao maturity degrees influenced bioactive compounds within cacao shells. They found that caffeine and theobromine values, as well as antioxidant capacity, increased when cacao pods were harvested at later maturity stages. They also found that subsequent fermentation also influenced antioxidant extraction processes, because of (1) oxygen-mediated oxidation due to enzymatic reactions, (2) polyphenols migration from cotyledons, (3) polymerization processes, (4) condensation processes, and (5) protein-binding processes (Adebo & Medina-Meza, 2020). The longer the fermentation process, the lower the inhibiting DPPH radicals activity, and this, in turn, influences antioxidant capacity (Lemborg et al., 2021).

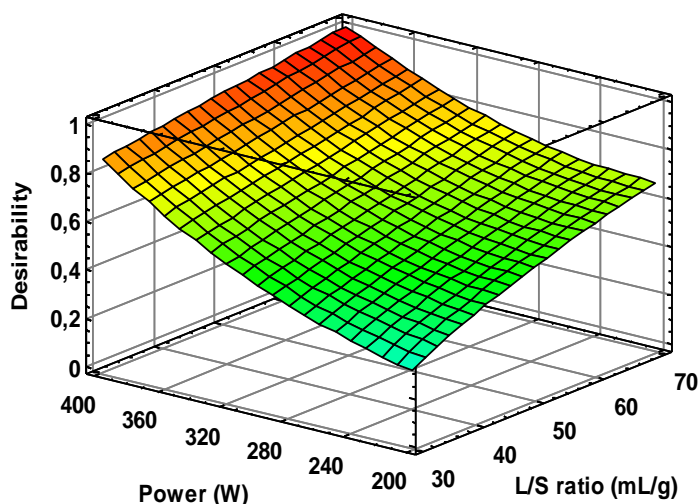
5.5.4 MAE optimal conditions

Box-Behnken Design was used because it allowed us to produce response surfaces without the need to run as many tests as with traditional methodologies. In order to extract the highest amount of compounds of interest, it is important to optimize the parameters that influence the extraction process. Dependent variables (extraction time [s], microwave power [W], and L/S ratio [g/mL]) were evaluated against extraction yield, TPC, and antioxidant capacity.

Extraction factors were optimized through response surface methodology, using a desirability function. In this sense, optimal conditions were: (1) for TPC 400 W, 224.11 s, and 70 mL/g: highest phenolic compounds yield, (2) for DPPH 400 W, 235.84 s, and 63.77 mL/g, and (3) for FRAP 400 W, 203.6 s, and 70 mL/g. Expected values under these optimal conditions correspond to: (1) TPC: 48.42 mg GA/g CBS, (2) DPPH: 344.73 $\mu\text{mol TE/g CBS}$, and (3) FRAP: 166.18 $\mu\text{mol TE/g CBS}$.

A multiple response optimization was carried out, considering the four response variables: extraction yield, phenolic compounds, and antioxidant capacity with the two evaluated methods (DPPH and FRAP). A desirability algorithm was used in order to explore the ideal factor combination that could satisfy a maximum value for all responses (Image 5-3). Desirability values close to 1 (one) revealed an excellent optimization. In this research, optimal values were: (1) extraction yield: 21.62%, (2) phenolic compounds: 45.68 mg gallic acid/ g CBS, and (3) total antioxidant capacity: 341.67 $\mu\text{mol TE/g CBS}$ for DPPH, and 165.05 $\mu\text{mol TE/g CBS}$ for FRAP.

Figure 5-3: CBS extracts multiple responses optimization (399.88 W, 217.42 s, and 69.71 mL/g).



5.5.5 Model analysis

Box-Behnken Design ANOVA is shown in Table 5-2. ANOVA shows the importance of the model through F and p values, for the four variables responses. A p value < 0.05 shows that regression coefficients for the model were significant. The lack-of-fit tests (p value < 0.05) for extraction yield and TPC were 0.8629 and 0.4345, respectively. Such data reinforces the importance of the model and suggest that the models can be adjusted suitably to the experimental findings.

R^2 coefficient and adjusted R^2 coefficient were also determined with ANOVA. R^2 coefficients for EY, TPC, DPPH, and FRAP, shown in Table 5-2, were 0.9716, 0.9165, 0.9213, and 0.9339, respectively, indicating, once more, that the models represent the experimental findings. Now, in terms of adjusted R^2 coefficients (EY: 0.93514, TPC: 0.80.92, DPPH: 0.874 y FRAP: 0.8678), these values are higher than 0.80, suggesting that there is a high degree of adjustment to the model (Umrigar et al., 2022).

Regression analysis for experimental data resulted in a second-order polynomial equation. This equation explains the behavior of both phenolic compounds and antioxidant capacity. A, B, and C, represent microwave power, extraction time, and L/S ratio, within MAE, respectively.

$$\text{EY} = -4.68426 - 0.0171515*A + 0.139314*B + 0.123462*C + 0.0000865775*A^2 - 0.0000163333*AB - 0.0001445*AC - 0.000274438*B^2 + 0.000145625*BC - 0.000692437*C^2$$

$$\text{TPC} = -30.4151 + 0.043025*A + 0.457326*B + 0.149563*C - 0.00102203*B^2$$

$$\text{DPPH} = -142.377 - 0.438057*A + 1.50601*B + 6.736*C + 0.00168732*A^2 - 0.00319285*B^2 - 0.0528169*C^2$$

$$\text{FRAP} = -62.8403 - 0.174138*A + 1.94908*B - 1.26844*C + 0.00125638*A^2 - 0.00135708*AB - 0.00403625*AC - 0.00345313*B^2 + 0.0318969*C^2$$

The equations show linear, quadratic, and interactive effects that dependent variables A, B, and C have in the responses (EY, TPC, DPPH, and FRAP). Coefficient signs (negative or positive) give an indication regarding the effect of each term within the response model. Both B (extraction time) and C (L/S ratio) had a positive coefficient for response variable yield (EY). For TPC, all three factors (A, B, and C) had a positive coefficient, which means that phenolic compounds increase in the same as these variables do so. Finally, the negative coefficient for microwave power (A), in its linear term, suggests that, for antioxidants, when microwave power increases, their concentration diminishes.

5.5.6 CBS extracts color

Colorimetric parameters obtained through the CIELAB system corresponded to luminosity (L^*), green-red coordinates (a^*), and blue-yellow coordinates (b^*). All color-related data were located in the first quadrant belonging to CIELAB color space, with positive values. Other parameters such as saturation (C) and hue angle (h^*) were determined following the methodology developed by Delgado-Ospina et al. (2021).

Chromatic parameters are shown in Table 5-3. L^* values for extracts decreased, while a^* and b^* parameters increased as a consequence of MAE, in comparison with color-related data from conventional extraction. This means a better extraction of color pigments. These results suggest that extracts became darker as a consequence of red- and yellow- pigments formation, due to a higher microwave power and extraction time (irradiation time).

Decreasing L* values and increasing a* and b* values, directly related to MAE, might be linked to an increase in temperature for the extracts, and, with higher temperatures, oxidation, condensation, and epimerization reactions for native phenolic compounds are more prone to occur (Taşkın y Aksoylu., 2020).

Table 5-3: CBS extracts' color coordinates

Assay	Microwave power (W)	Extraction time (s)	Liquid-to-solid ratio (mL/g)	L*	a*	b*	C*	h*
1	200	240	50	83.05	9.62	52.78	53.65	79.67
2	200	180	70	88.23	4.45	38.75	39.01	83.45
3	400	180	30	64.09	28.7	78.38	76.12	67.49
4	200	180	30	81.31	11.27	57.08	58.18	78.83
5	400	120	50	81.95	10.41	53.81	54.81	79.05
6	200	120	50	90.33	2.65	32.99	33.09	85.41
7	400	240	50	67.44	27.02	75.01	77.81	69.58
8	300	240	70	83.65	9.36	50.19	51.05	79.44
9	300	240	30	69.12	23.42	73	76.66	72.22
10	300	120	70	91.08	2.26	30.01	30.09	85.69
11	300	120	30	84.65	7.61	49.15	49.73	81.2
12	400	180	70	80.66	12.56	55.83	57.22	77.32
13	300	180	50	81.91	10.7	55.39	56.41	79.07
14	300	180	50	81.27	11.42	56.16	57.31	78.51
15	300	180	50	82.4	10.25	54.4	55.35	79.33
16	300	180	50	83.88	8.67	50.56	51.29	80.27
17	300	180	50	82.52	10.09	53.84	54.77	79.39
Control 1			70	92.79	1.16	26.42	26.32	88.17
Control 2			50	90.48	2.48	33.77	33.79	86.08
Control 3			30	84.89	7.09	49.35	49.85	81.82

The results obtained in this research are higher for L* (90.48) and b* (33.77) values, in comparison with data reported by Utami et al. (2021), who found for these same parameters values of 51.34 and 14.84, respectively. They used a conventional extraction methodology, which suggests that our CBS extracts have a more intense yellow coloration, but a lesser red hue, even though TPC values in both studies are similar.

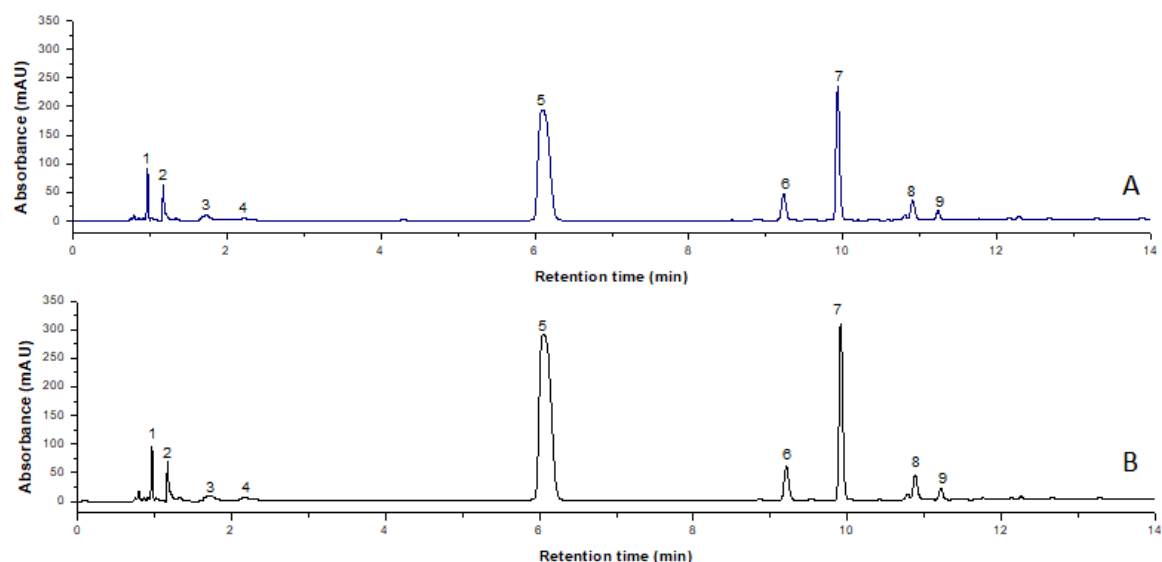
Samples with high values for a^* and b^* parameters were the ones where MAE had a microwave power of 400 W. These samples also have the lowest values for L^* and, therefore, are the darkest extracts. However, extracts obtained with a L/S ratio 70 mL/g presented a higher hue angle and also a higher color purity in comparison with other extracts, which is indicative of a more intense yellow coloration too.

It is important to highlight that for CBS, other factors, such as fermentation, drying, and roasting conditions and particle size, also influence extract colorations (Botella-Martínez et al., 2021). This has been confirmed by Utami et al. (2021), who reported that CBS present a darker brown color, linked to roasting conditions, and Botella-Martínez et al. (2021), who found that color coordinates are influenced by a reduction in particle size. In this way, for all color parameters, values increased when size particle decreased.

5.5.7 HPLC analysis

CBS chromatographic analysis revealed the same peaks in both optimal conditions and control extracts, as shown in Image 5-4. Compounds 5 and 7 were identified as theobromine and caffeine (Table 5-4). These two compounds represented 79.0 and 82.3% of the chromatographic area, respectively, at 290 nm, both for optimal and control extracts (Table 5-4). Other compounds were not able to be identified. Theobromine and caffeine identification in the samples as main components in the HPLC analysis goes in tune with previous reports by Jokić et al. (2018), who used subcritical water for extracts' preparation. Neither (+) catechin, nor (-) epicatechin were found in this research. These two compounds, alongside with procatechuic acid and procyanidin B2, have been reported as present in CBS extracts (using subcritical water, a mix of methanol/water, and alkaline ethyl acetate) (Rebollo-Hernandez et al., 2021). Differences between our research and previous reports could be associated with growing agricultural and climatic conditions, cacao genotype, and extraction conditions.

Figure 5-4: RP-UHPLC CBS profiles at 290 nm: (A) under optimal conditions, and (B) under control conditions.



In addition, a previous study revealed that pure caffeine does not present an antioxidant activity for DPPH (Sun and Ho, 2001). Moreover, a HPLC-DPPH on-line assay showed that neither caffeine nor theobromine had such an antioxidant activity (Zhang et al., 2013). This essentially means that DPPH antioxidant activity observed in raw extracts could be the result of compounds with a chromatographic area below 6% (represented by peaks 1 to 4, 6, 8, and 9, in Table 5-4).

Table 5-4: CBS extracts retention time, UV, tentative identification and chromatographic area at 290 nm.

No	Rt (min)	UV max (nm)	Tentative identification	Chromatographic Area at 290 nm (mUA*min)	
				Optimal	Control
1	0.96	230; 280	-	1.963	2.112
2	1.17	228; 279	-	1.929	2.195
3	1.73	225	-	1.377	1.512
4	2.22	228; 270	-	0.672	0.892
5	6.09	231; 274	Theobromine*	32.197	49.987
6	9.23	252; 300sh; 320	-	3.147	4.039
7	9.93	231; 274	Caffeine*	12.650	16.976
8	10.91	230; 308	-	1.911	2.458
9	11.24	230; 280	-	0.935	1.164

5.6 Conclusion

CBS, even though being a waste by-product in cacao processing, have an important amount of polyphenolic and antioxidant compounds. In this sense, this by-product has turned to be an important source of these bioactive compounds, having potential uses in the food industry. Phenolic and antioxidant extraction by MAE might improve the release of these bioactive molecules within CBS, prompting a fast recovery, and using minimal amounts of solvents, in contrast with other extraction methods. Extraction time was the most influential factor on producing higher values for EY, TPC, and FRAP antioxidant capacity.

CRedit authorship contribution statement

Martha Cecilia Rincón-Soledad: Investigation, Formal analysis, Software, Writing - original draft. Juanita Pulido- Teuta: Methodology, Writing -original draft. Carlos Eduardo Narvaez-Cuenca: Methodology, Investigation, Writing - review & editing, Supervision. Luis-Felipe Gutiérrez: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - review & editing, Supervision, Guillermo Balseiro translation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos (ICTA) of the Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá and Agrosavia. The authors thank to all the staff of Agrosavia that collected and processed the cocoa fruits and for obtaining the by-products. Maria Cristina Lizarazo-Aparicio: Investigation, Formal analysis.

6. Ensayo Citotoxicidad de extractos de CPH y CBS sobre células tumorales

6.1 Introducción

International Agency for Research on Cancer realiza la recopilación de datos a nivel global y por país de los diversos tipos de cáncer que afectan a la población, estimando que una de cada cinco personas en todo el mundo desarrolla cáncer durante su vida, estadísticamente registran esta información en su página Cancer Today, para el 2020 se reportaron 7.794.798.844 casos de cáncer de los cuales 19.292.789 son nuevos casos para ese mismo año, de estos nuevos casos reportados los principales corresponden a cáncer de mama (11,7%), cáncer de pulmón (11,4%), cáncer colorrectal (10%), cáncer de próstata (7,3%) y cáncer de estómago con un (5,6%). En las mujeres, el cáncer de mama es el principal cáncer seguido de colorrectal y pulmón, estos tres corresponden al 42,3% de los nuevos casos a nivel mundial, para el género masculino el principal cáncer corresponde a pulmón, seguido de próstata y colorrectal sumando 39% de casos. A nivel mundial el cáncer de pulmón es la causa más común de mortalidad por cáncer (18%), seguido de cáncer colorrectal (9,39%), cáncer de estómago (7,7%), cáncer de mama (6,9%) y cáncer de próstata (3,8%).

En Colombia igualmente se reportan los mismos tipos de cáncer que afectan a la población mundial, pero varía el porcentaje y orden, el principal cáncer que afecta a la población colombiana es cáncer de mama (13,7%), seguido de cáncer de próstata (12,8%), cáncer colorrectal (9,5%), cáncer de estómago (7,3%) y cáncer de pulmón (6,1%). Por género el cáncer de mama, colorrectal y cuello uterino son los que principalmente afecta a las mujeres colombiana en cuanto a los hombres los principales son cáncer de próstata, estómago y colorrectal, estos tipos varían un poco con respecto a los que más afectan a nivel mundo. En cuanto a las cifras de mortalidad, para Colombia el cáncer de estómago

(11,7%) es el de mayor mortalidad, seguido por el cáncer de pulmón (11,1%), cáncer colorrectal (9.89%), cáncer de mama (8%), cáncer de próstata (7%).

La prevención del cáncer es uno de los mayores retos de salud pública, gubernamentalmente se ejecuta el Plan decenal para el control de Cáncer en Colombia para el período 2012-2021 y se encuentra en construcción el plan para 2022-2031, por parte del Ministerio de Salud y Protección Social, este plan está dividido en seis líneas estratégicas, como su nombre lo indica recopila todas las estrategias de control, detección, atención, mejoramiento de la calidad de vida, gestión del conocimiento y tecnología para el control del cáncer. Una de las estrategias es la promoción y prevención, por lo que actualmente se realizan diversas campañas especialmente por la Liga Colombiana contra el cáncer (LCCC), quien dentro de su objetivo misional esta educar a la población sobre la importancia de la prevención y detección temprana del cáncer y apoyo integral de esta enfermedad, esta institución adelanta campañas educativas principalmente con la divulgación de información, celebración del día mundial del cáncer, capacitaciones a empresas. Para la prevención del cáncer de pulmón la Liga y la Asociación Colombiana de Universidades (ASCUN) firmaron un convenio para la promoción de la salud, la lucha antitabaco y la prevención del cáncer en los estudiantes universitarios a nivel nacional a través de actividades de sensibilización, difusión e investigación en los centros educativos.

La citotoxicidad celular es la alteración de las funciones básicas que conlleva a que se produzca un daño que puede ser detectable (García Arciniegas & Ochoa Pineda, 2017). La evaluación citotóxica constituye una vía simple, rápida y económica para obtener una valiosa información acerca de si la actividad antioxidante de extractos de plantas tiene algún efecto sobre células tumorales y representa evidencias experimentales en la búsqueda de nuevos compuestos antitumorales. El potencial químico y biológico del cacao está apoyado por algunos estudios de actividad citotóxica en varias líneas celulares por ejemplo Taparia & Khanna (2016) sugieren que las catequinas y procianidinas del cacao son citotóxicas para el cáncer de ovario, generando cambios morfológicos apoptóticos, daño al ADN y muerte celular, igualmente Cinar et al. (2021) realizaron un artículo de revisión recopilando algunos estudios que investigan las posibles funciones terapéuticas del uso de cacao y (CBS) en el cáncer, a continuación se relacionan tres de estos estudios, Ki et al. (2005) probaron fracciones de CBS en células epiteliales de hígado obteniendo una inhibición de 66%, lo que sugiere que los extractos pueden desarrollarse como un

producto quimiopreventivo potencial. Yamagishi et al. (2003), realizaron investigaciones in vivo en ratas a las cuales se les indujo carcinogénesis pulmonar, posteriormente se usó diferentes dosis de proantocianidinas del licor de cacao (CLPr) observando un reducido porcentaje y multiplicidad de carcinoma en las ratas tratadas con CLPr. Gómez-García et al. (2020) mostraron que el suministro de extracto de cacao suprimió notablemente el desarrollo de carcinoma generado por radiación UV, sugiriendo que la administración oral de extracto de cacao puede proteger contra la radiación ultravioleta que causa fotocarcinogénesis en ratones.

Las líneas celulares han sido ampliamente utilizadas para la realización de pruebas de citotoxicidad *in vitro*, existe una gran cantidad de líneas celulares obtenidas de diferentes órganos, para este estudio se utilizó las siguientes líneas celulares HT- 29 (adenocarcinoma colorrectal), A549 (adenocarcinoma de pulmón), CAL-27 (carcinoma escamo celular de lengua) y MCF-7 (adenocarcinoma de glándula mamaria). Para establecer la selectividad y/o seguridad de los extractos, los análisis también fueron realizados sobre los fibroblastos L929, una línea celular usada como Gold estándar en estudios de biocompatibilidad.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Propagación y mantenimiento de líneas celulares

El potencial citotóxico de los extractos fue evaluado *in vitro* sobre las líneas celulares HT-29, A549, CAL-27 y MCF-7. Para establecer la selectividad y/o seguridad de los extractos, los análisis también fueron realizados sobre los fibroblastos L929, una línea celular usada como Gold estándar en estudios de biocompatibilidad. Las células fueron propagadas en medio dimetilsulfóxido (DMEM) (UltraCruzTM) suplementado con piruvato de sodio (1mM), HEPES (25 mM), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco BRL).

Todas las líneas fueron propagadas en frascos de cultivo celular de 25 cm², a 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa. Para el subcultivo y la criopreservación, las células se dejaron crecer máximo hasta un 80% de confluencia, el

medio se reemplazó por buffer fosfato salino (PBS) para lavar la monocapa y luego esta se trató con una solución de tripsina 0,025% - EDTA 0,03 % durante 5 minutos a 37°C, esto para separar las células del soporte. La suspensión obtenida fue contada con azul de tripano y usada en los experimentos posteriores.

6.2.2 Preparación de extractos

La solución stock de los extractos fue preparada en una mezcla 1:1 de (DMSO) y (PBS) a una concentración de 50 mg/ mL. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio de cultivo en 5 diluciones seriadas 1:2 (100, 50, 25, 12,5 y 6,25 µg/mL). La concentración final de DMSO en los pozos no superó el 0,1%.

6.2.3 Ensayo de citotoxicidad in vitro

Para el ensayo, las células se cultivaron en condiciones estándar de cultivo celular. Cuando la monocapa alcanzó entre el 70 y 80% de confluencia, las células fueron separadas del soporte, contadas y luego sembradas en placas de 96 pozo fondo plano a una densidad de 20000 (HT-29), 10000 (CAL-27) y 5000 (MCF-7, A549 y L929) células por pozo. Una vez las células se adhirieron al soporte fueron expuestas por 24, 48 y 72 h a 5 diluciones seriadas 1:2 de los extractos (rango: 100 – 6,25 µg/mL). Como control de muerte se usó paclitaxel 100 µM. El efecto del vehículo se evaluó en todos los ensayos. El potencial citotóxico de los extractos fue evaluado mediante el ensayo de reducción de resazurina.

6.2.4 Ensayo de reducción de resazurina

Transcurridos los tiempos de exposición a los tratamientos, el medio se reemplazó por 100 µl de resazurina 44 µM, después de 4 horas de incubación, la fluorescencia emitida por las células viables y/o metabólicamente activas se cuantificó a una longitud de onda de excitación de 535 nm y una de emisión de 595 nm usando un espectrofluorómetro TECAN GENios. Los ensayos se realizaron en tres semanas independientes por triplicado. Los resultados se reportaron en términos de porcentajes de viabilidad respecto al control sin tratamiento.

6.2.5 Análisis Morfológico

Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron observadas bajo un microscopio invertido AxioVert A1 acoplado a una cámara AxioCam 305 color. Una imagen representativa de los cultivos tratados y no tratados fue capturada a las 72 h de exposición.

6.3 Resultados y discusión

Como se observa en la Fig. 6-1 y 6-2 la viabilidad de las células no se afecta en ninguna de las condiciones evaluadas, sugiriendo que el potencial antiproliferativo de los extractos de cascarilla y cacota sobre las células HT-29, CAL-27, A549 y MCF-7 es débil. La categorización de la actividad se basó en los valores de concentraciones inhibitorias CI50, (concentración del extracto necesaria para inhibir la proliferación celular en un 50%). Siendo un extracto activo en concentraciones ≤ 20 $\mu\text{g/mL}$; moderadamente activo en concentraciones >20 - 100 $\mu\text{g/mL}$, débilmente activo >100 - 1000 $\mu\text{g/mL}$ e inactivo >1000 $\mu\text{g/mL}$ (Atjanasuppat et al., 2009; Baharum et al., 2014).

Figure 6-1: Porcentaje de Viabilidad de extractos de cascarilla (CBS) y cacota (CPH) de cacao sobre líneas tumorales A549 y HT-29.

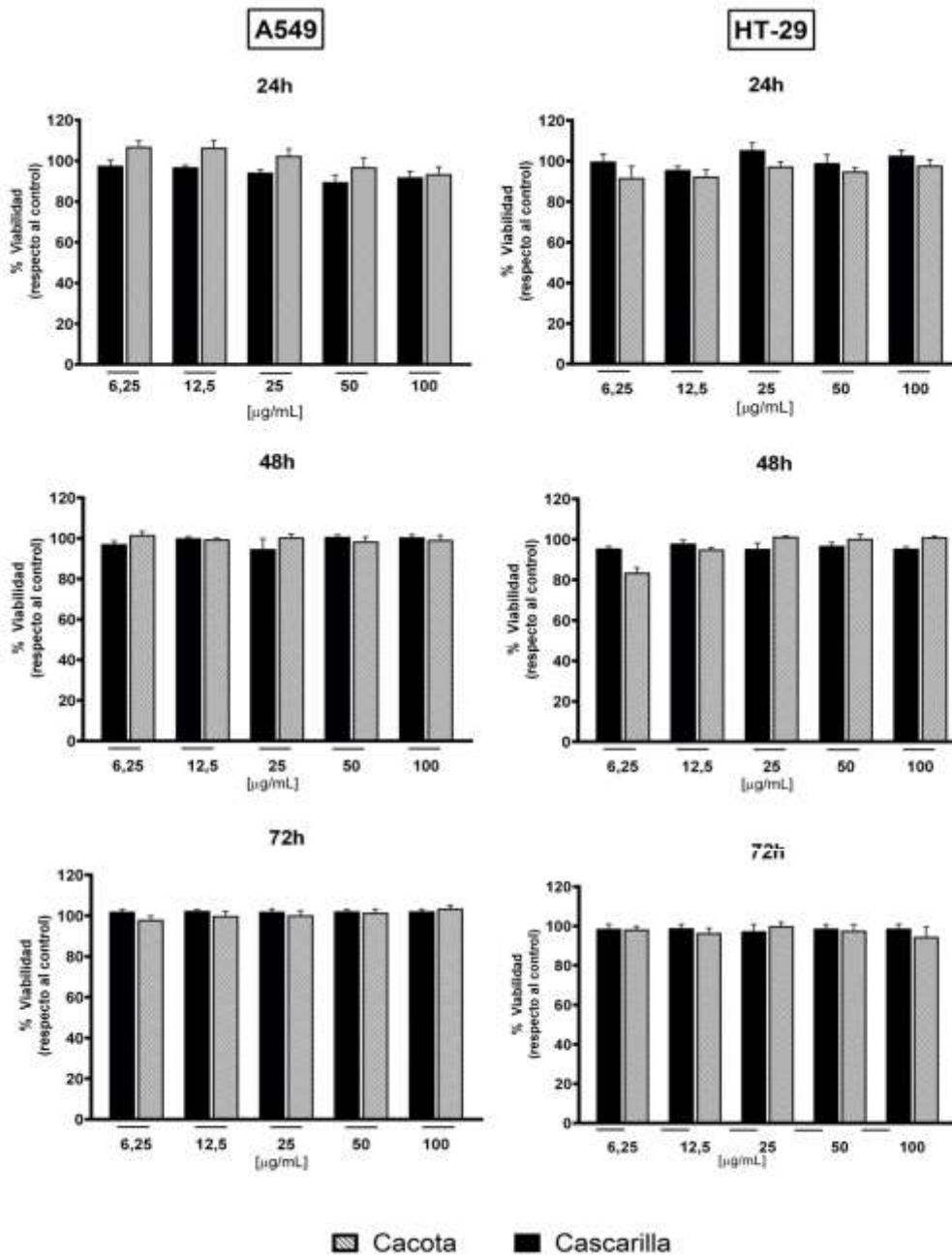
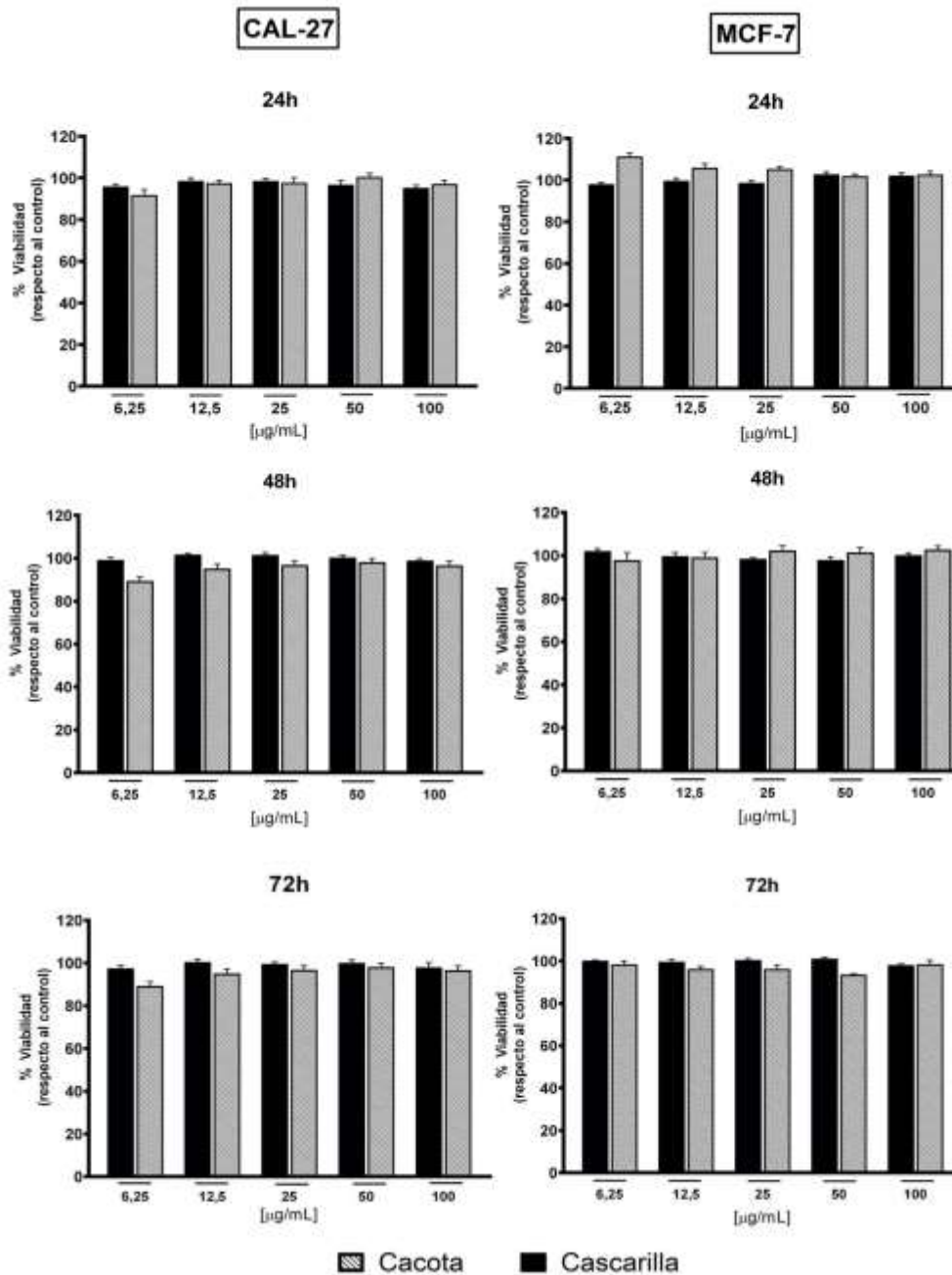


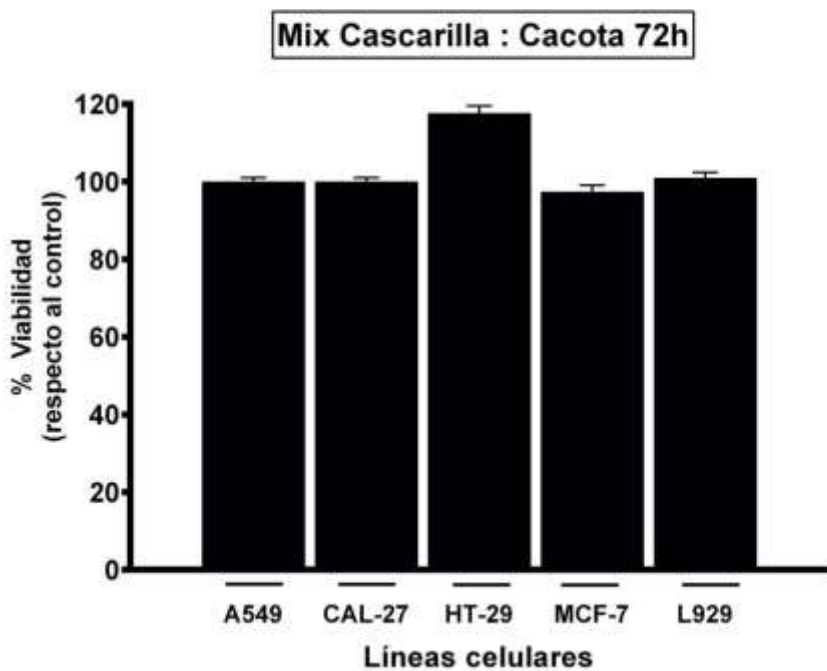
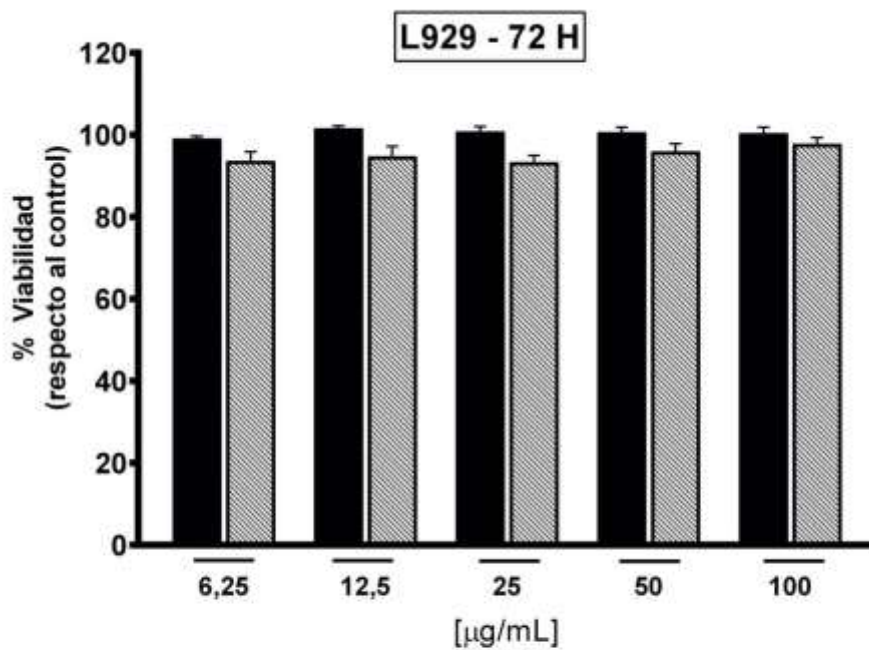
Figure 6-2: Porcentaje de Viabilidad de extractos de cascarilla (CBS) y cacota (CPH) de cacao sobre líneas tumorales CAL-27 y MCF-7.



Buscando evaluar posibles efectos sinérgicos entre los principios activos de los extractos de CBS y CPH, se evaluó una mezcla 1:1 de estos extractos sobre las líneas tumorales A549, CAL-27, HT-29 y sobre los fibroblastos L929. El ensayo de citotoxicidad se realizó a 72 h de exposición siguiendo las mismas condiciones experimentales del primer análisis. Los resultados dejan ver que la actividad metabólica de las líneas celulares no se afecta

después de 72 horas de incubación, confirmando que los extractos solos o en combinación no afectan la viabilidad celular en concentraciones menores a 100 µg/mL (Fig. 6-3).

Figure 6-3: Porcentaje de Viabilidad de extractos de cascarilla (CBS) y cacota (CPH) A. en línea tumoral L929 a 72 horas. B. Mezcla 1:1 de extracto de CBS y CPH sobre líneas A549, CAL-27, HT-29, MCF-7, L929.



Cabe señalar que en todas las pruebas experimentales se incluyó un control de muerte (paclitaxel a 100µM) y control del vehículo (mezcla 1:1 DMSO:PBS). Como se esperaba el

paclitaxel indujo una clara reducción de la supervivencia celular, demostrándose la sensibilidad de las células frente xenobióticos. Por otro lado, el vehículo no afecto ni la morfología ni actividad metabólica celular.

6.3.1 Análisis Morfológico

Los análisis morfológicos mostraron que ni el crecimiento, ni la morfología de las células tumorales se afecta con los tratamientos evaluados (Fig. 6-5 a 6-7) por el contrario, se observa un incremento en la confluencia celular, para las células normales L929 (Fig. 6-4).

Figure 6-4: Los extractos de cascarilla y cacota de cacao no afectan ni la morfología ni el crecimiento de las células L929 después de 72 h de incubación a 100 µg/mL. **A.** Células sin tratamiento. **B.** Células tratadas con el mix 1:1 del extracto de cascarilla y cacota 100 µg/mL por 72 h **C.** Células tratadas extracto de cascarilla 100 µg/mL **D.** Extracto de cascarilla 100 µg/mL después de 72 h de incubación.

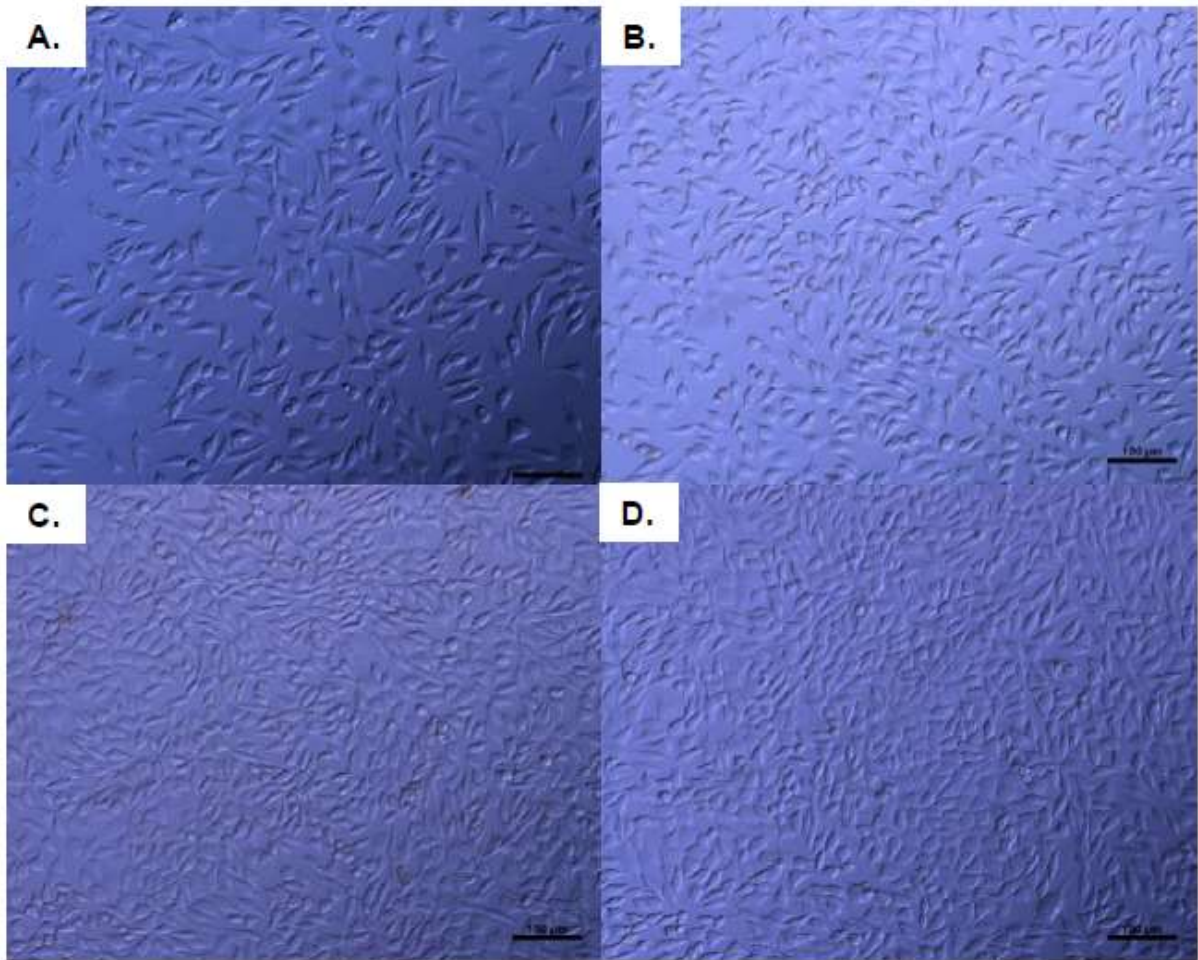


Figure 6-5: Los extractos de cascarilla y cacota de cacao no afectan ni la morfología ni el crecimiento de las células CAL-27 después de 72 h de incubación a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **A.** Células sin tratamiento. **B.** Células tratadas con el mix 1:1 del extracto de cascarilla y cacota 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 72 h **C.** Células tratadas extracto de cascarilla 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **D.** Extracto de cascarilla 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de 72 h de incubación.

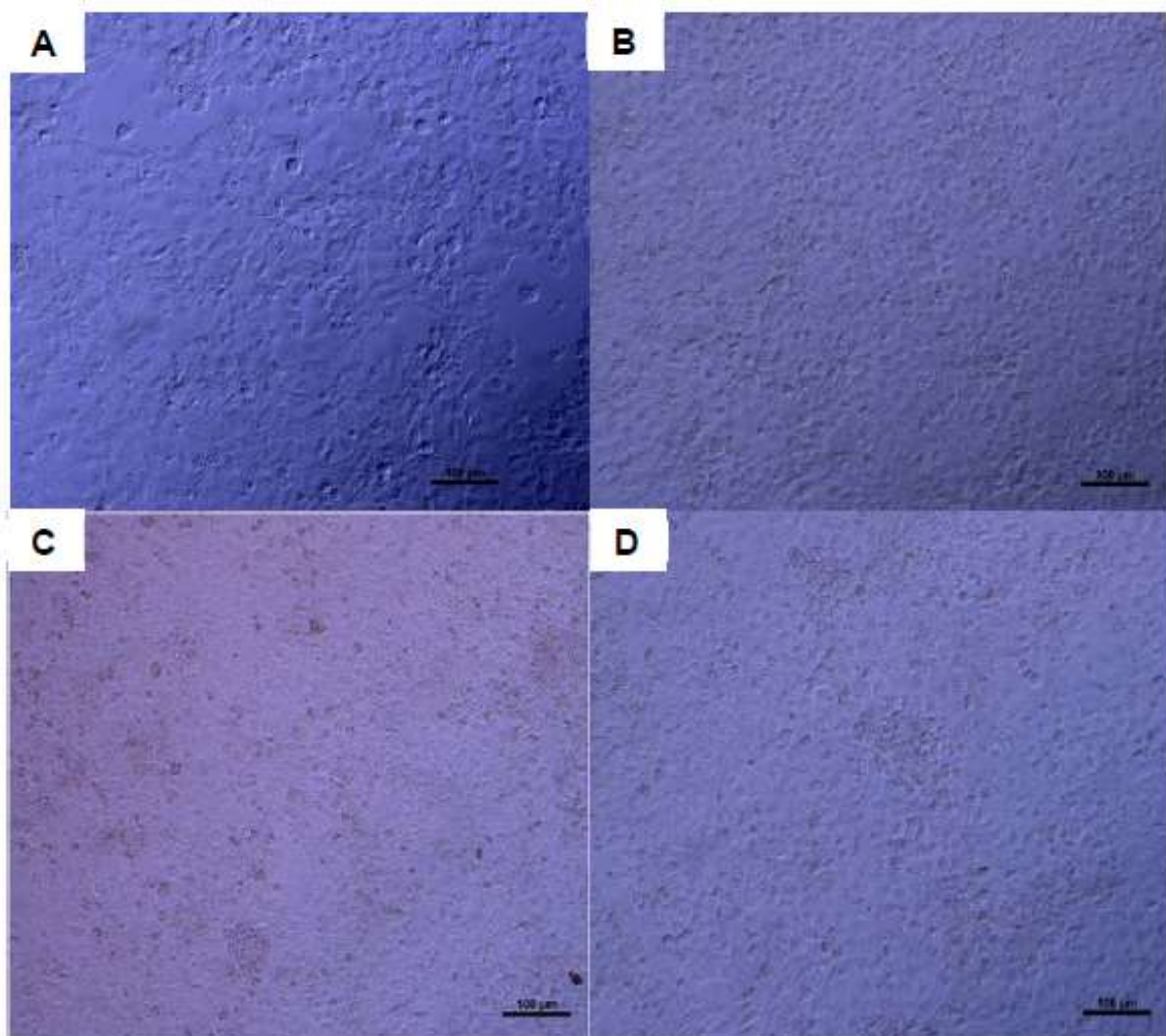


Figure 6-6: Los extractos de cascarilla y cacota de cacao no afectan ni la morfología ni el crecimiento de las células A549 después de 72 h de incubación a 100 µg/mL. **A.** Células sin tratamiento. **B.** Células tratadas con el mix 1:1 del extracto de cascarilla y cacota 100 µg/mL por 72 h **C.** Células tratadas extracto de cascarilla 100 µg/mL **D.** Extracto de cascarilla 100 µg/mL después de 72 h de incubación.

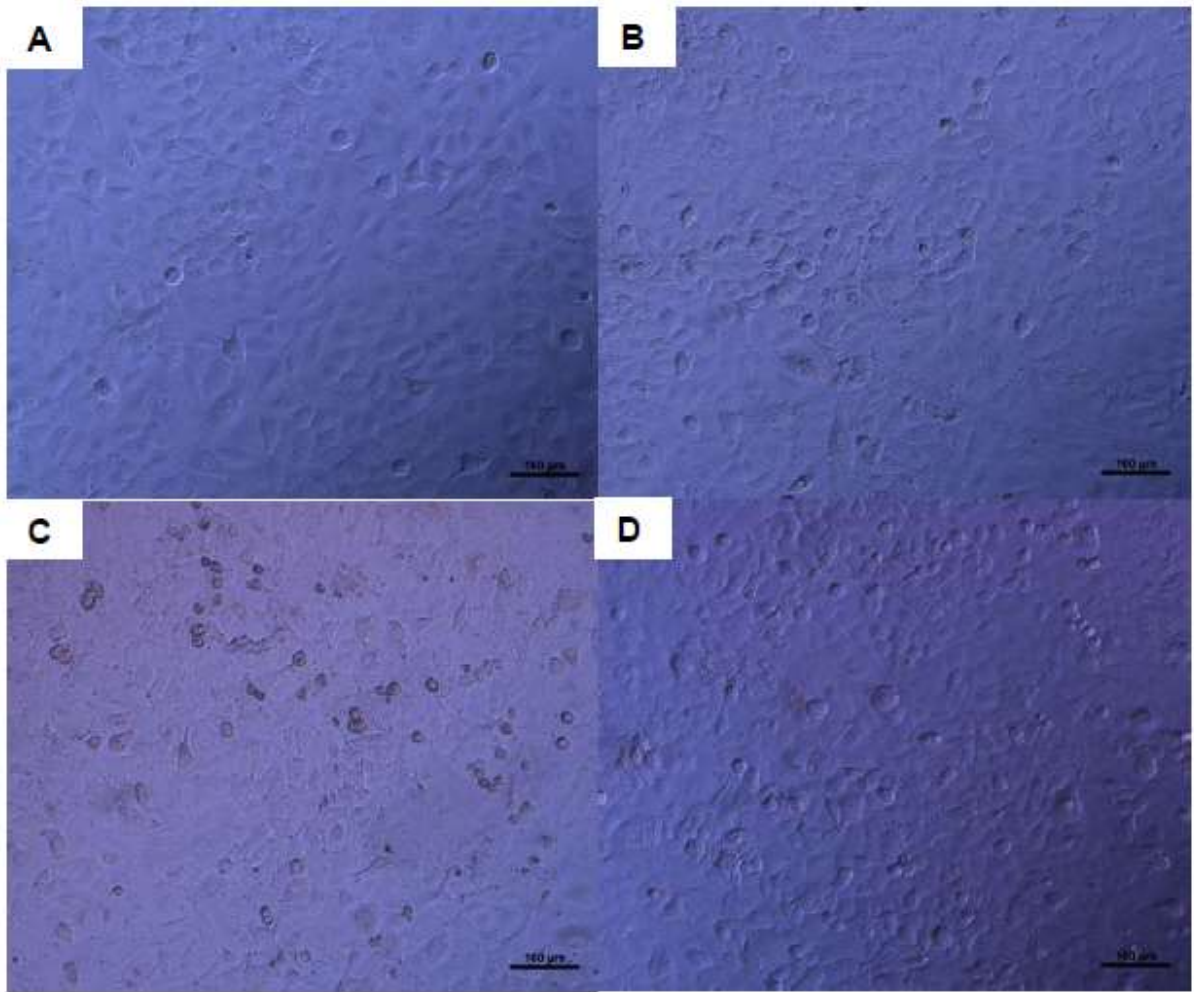
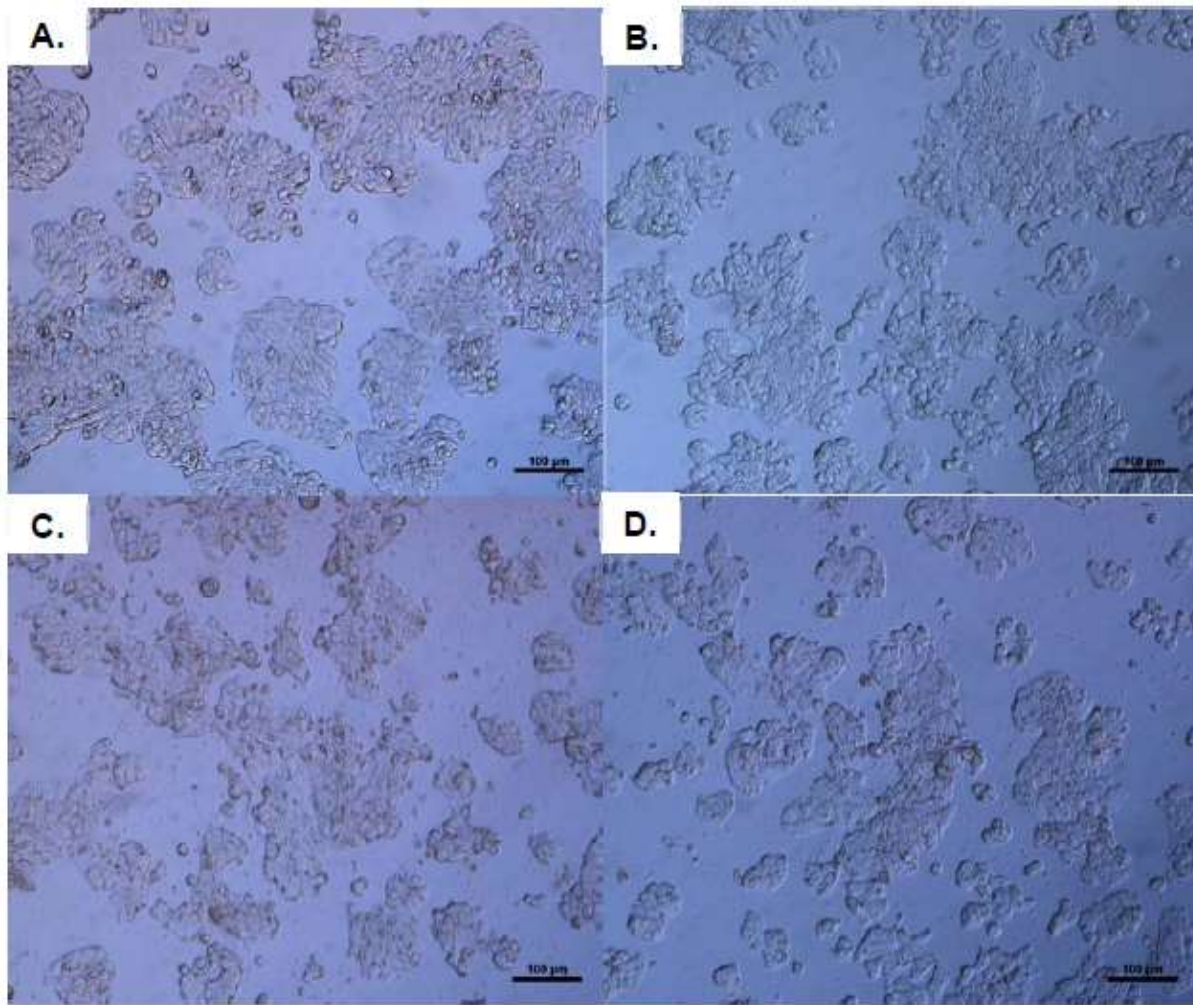


Figure 6-7: Los extractos de cascarilla y cacota de cacao no afectan la morfología de las células HT-29 después de 72 h de incubación a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. **A.** Células sin tratamiento. **B.** Células tratadas con el mix 1:1 del extracto de cascarilla y cacota 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 72 h **C.** Células tratadas extracto de cascarilla 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ **D.** Extracto de cascarilla 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de 72 h de incubación.



7. Conclusiones y recomendaciones

7.1 Conclusiones

El uso de extracción asistida por microondas permite obtener mayores contenidos de compuestos fenólicos y antioxidantes que la extracción convencional.

Las condiciones óptimas de extracción usando microondas de compuestos fenólicos y antioxidantes sugeridas por el método superficie respuesta son, 400 W, 240 s y 67 mL/g para cacota y 399,91 W, 186,15 s y 69,94 mL/g para cascarilla.

La actividad citotóxica in vitro de los extractos obtenidos en condiciones óptimas frente a células de cáncer de colon HT-29 no mostro una alta sensibilidad a los extractos de cascarilla y cacota de cacao, presentando unos porcentajes de crecimiento celular muy altos, lo que indican una baja viabilidad para el control de las células de cáncer HT-29.

Los subproductos del procesamiento del cacao son potenciales residuos agroindustriales de gran utilidad para la extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante. La extracción asistida por microondas investigada en este estudio mostró un gran potencial como método de extracción ecológico para la valorización de estos subproductos de desecho del procesamiento del cacao.

7.2 Recomendaciones

Aunque las condiciones usadas para la extracción asistida por microondas generaron valores superiores a la extracción convencional, se recomienda el uso de una mayor potencia, lo cual podría potenciar el aumento del rendimiento de compuestos fenólicos.

Igualmente se podría usar unos tiempos de extracción asistida por microondas mayores, principalmente para la cacota, teniendo en cuenta que la metodología de superficie de respuesta da como resultado que los mayores valores se encuentran en el límite superior

usado para este estudio 240 segundos, pudiéndose hallar valores superiores de compuestos fenólicos a mayores tiempos de extracción.

Aunque el control fue evaluado con tres relaciones liquido-sólido diferentes no se encontró diferencia significativa en estas relaciones por lo que se recomienda el uso de un solo control con la menor relación liquido-sólido, que garantizaría una mayor área de superficie de contacto entre el CPH y el solvente durante la extracción.

Debido a la complejidad de la composición de los extractos etanólicos obtenidos, se requiere más investigación para identificar todos los compuestos fenólicos extraídos de este material de desecho por medio de extracción asistida por microondas, y para determinar si el efecto de las variables de procesamiento puede afectar la naturaleza molecular y la integridad de los compuestos fenólicos. Como tendencias futuras, el uso de enfoques ecológicos podría emplearse masivamente para producir extractos bioactivos a partir de biomásas agroalimentarias promisorias como el cacao, con el objetivo de generando biorrefinerías con procesos más limpios y eficientes, incorporando conceptos de sustentabilidad, integración e intensificación de procesos.

A. Anexo: Contribuciones

Resumen remitido al 5th International Congress on Research and Innovation in Food Engineering, Science and Technology - IICTA 2021.

MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY FROM COCOA PROCESSING BY-PRODUCTS AS VALORIZATION STRATEGY

Martha Cecilia Rincón Soledad¹, Maria Cristina Lizarazo Aparicio¹, and Luis-Felipe Gutiérrez^{2(*)}

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

² Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

(*)*Email:* lfgutierrez@unal.edu.co

ABSTRACT

In this work the extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa processing by-products (pod husk (CPH) and bean shell (CBS)) was carried out by means of microwave assisted extraction (MAE), as valorization strategy. The effects of microwave power (200-400 W), solvent-to-solid ratio (30-70 mL/g), and extraction time (120-240 s) on the total phenolic content (TPC), and antioxidant capacity (evaluated by means of the DPPH and FRAP assays) were investigated using a Box-Behnken design. A solution consisting of 63% aqueous ethanol was used as extraction solvent. Response surface methodology was used to estimate the optimal operating conditions. Under the optimal conditions the ethanolic extracts from CPH and CBS reached a TPC of 43.04 and 46.15 mg gallic acid/g sample, respectively. The antioxidant activities determined by the DPPH method were of 434.44 and 351.95 $\mu\text{mol Trolox/g}$ for the CPH and CBS, respectively, while those evaluated by using the FRAP assay were of 144.71 and 165.78 $\mu\text{mol Trolox/g}$ for the CPH and CBS, respectively. These results indicate that cocoa processing by-products are a promissory source of natural compounds with antioxidant activity, and that MAE could be used for their extraction in shorter times compared to the conventional processes.

INTRODUCTION

The interest in phenolic compounds has significantly increased in the last years, due to their multiple health benefits and antioxidant activity [1]. The conventional extraction techniques employed for obtaining phenolic compounds processes are associated with high solvent consumption, high temperatures, and long extraction times [2]. Recently, microwave and ultrasound assisted extractions, or even pulse electric fields have been used, before or during the extraction processes, to enhance the recovery of phenolic compounds from

several agro-industrial by-products, as intensification strategy [2]. These extraction technologies are considered as sustainable techniques, since they can complete processes in shorter times with high reproducibility and simplified manipulation, resulting in a higher quality of the final products. In addition, regarding the environmental impact, those processes require only a fraction of the energy demanded by the conventional extraction methods [3].

Cocoa processing by-products have recognized by their important content of bioactive molecules, including phenolic compounds [4]. The aim of this study was to investigate the MAE as emerging technology for extracting phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa processing by-products. The operating parameters were optimized by using a Box-Behnken experimental design.

MATERIALS AND METHODS

Cocoa (clone TCS01) from the Department of Nariño was used as raw material. The cocoa was fermented and the CPH was collected and dried. After roasting, the CBS was separated. Both by-products were ground and sieved, and the fractions passing through a 100 μm mesh were used for the MAE. The CPH and CBS samples were extracted using an Advanced Microwave Extraction System ETHOS X (Milestone, Shelton, CT, USA), equipped with a rotor of 12 Teflon hermetically closed vessels with magnetic stirring. After extraction, the vessels were cooled in an ice bath for 10 min. The extracted samples were vacuum filtered and diluted to 100 mL with the same solvent used in their extraction. The extracts were poured in Falcon tubes covered with aluminium foil, and kept at -40°C until their further analyses. The TPC was determined by the Folin-Ciocalteu method, and antioxidant capacity (evaluated by means of the DPPH and FRAP assays) were determined following the methods described by Sanchez-Reinoso et al. [1] and Sánchez-Camargo et al. [2]. A Box-Behnken design was used to evaluate the effects of the microwave power, solvent-to-solid ratio, and extraction time on the TPC and antioxidant activity of the extracts. Five replicates at the central point were carried out to estimate the random error and to examine the presence of curvature in the response surfaces. A total of 17 experiments were carried out in triplicate, which were programmed and optimized using the Design Expert software (Version 10.0.6, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN). The results were reported as mean \pm standard deviation of three measurements, and analysis of variance (ANOVA) was carried out to evaluate the effects of the MAE operating parameters.

RESULTS

The statistical analysis revealed a significant effect of the three variables on the TPC and antioxidant activity of the extracts, being the microwave power the most significant operating variable for extracting phenolics from CPH, while the extraction time was the most significant operating variable for CBS, as shown in Figure 1.

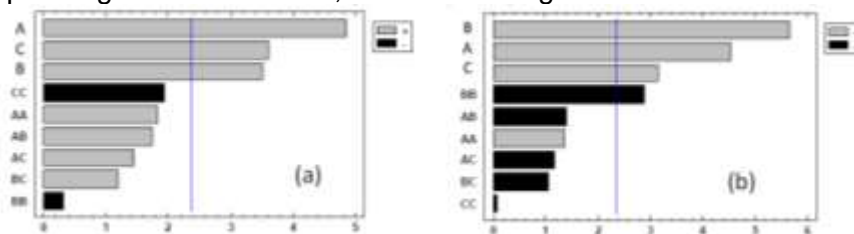


Figure 1. Pareto chart for the effects of microwave power (A), extraction time (B) and solvent-to-solid ratio (C), during the MAE of cocoa processing by-products (CPH (a) and CBS (b)) on the total phenolic compounds.

CONCLUSIONS

Cocoa processing by-products are potential agro-industrial residues of great for extracting phenolic compounds with antioxidant activity. The MAE investigated in this study showed great potential as eco-friendly extraction method for the valorization of this waste. The optimal conditions for extracting phenolic compounds for CPH were 400W, 230 s, and a solvent-to-solid ratio of 70 mL/g, while for the CBS were 400W, 197 s, and 70 mL/g. Under these conditions the concentration of phenolic compounds were of 43.04 and 46.15 mg gallic acid/g sample, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Universidad Nacional de Colombia and Agrosavia.

REFERENCES

- [1] Sanchez-Reinoso, Z., Mora-Adames, W. I., Fuenmayor, C. A., Darghan-Contreras, A. E., Gardana, C., & Gutiérrez, L.-F. *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification*, 153 (2020) 107922.
- [2] Sánchez-Camargo, A. P., Ballesteros-Vivas, D., Buelvas-Puello, L. M., Martínez-Correa, H. A., Parada-Alfonso, F., Cifuentes, A., Ferreira, S. R. S., & Gutiérrez, L.-F. *LWT - Food Science and Technology*, 137 (2021) 110414.
- [3] Chemat, F., Abert Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Nutrizio, M., Rezek Jambrak, A., Munekata, P. E. S., et al. *Green Chemistry*, 22(8) (2020), 2325–2353.
- [4]. Mellinas, A. C., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. *LWT - Food Science and Technology*, 127 (2020) 109361.

Poster

Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa processing by-products as valorization strategy

Martha Cecilia Rincón Soledad¹, María Cristina Lizarazo Aparicio¹, and Luis-Felipe Gutiérrez^{2(*)}

¹ Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

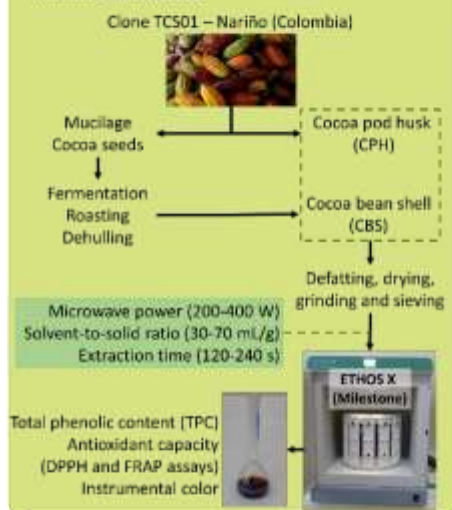
² Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, Bogotá, D.C., Colombia

(*)Email: lf Gutierrez@unal.edu.co

Introduction

The interest for phenolic compounds has increased recently, due to their multiple health benefits and antioxidant activity [1]. The conventional extraction techniques used for obtaining these compounds are characterized by their high consumption of solvents, the use of high temperatures, and long extraction times [2]. Emerging technologies such as microwave assisted extraction (MAE) have been investigated to enhance the recovery of biomolecules from several agro-industrial by-products [2]. MAE can complete extraction processes in shorter times with high reproducibility and simplified manipulation, resulting in a higher quality of the final products. In addition, MAE requires only a fraction of the energy demanded by the conventional methods [3]. Cocoa processing by-products (CPB) have been recognized by their important content of bioactive molecules, including phenolic compounds [4]. The aim of this study was to investigate MAE for obtaining phenolic compounds with antioxidant activity from CPB. The operating MAE parameters were optimized by using a Box-Behnken experimental design.

Materials and Methods



Conclusions

Cocoa processing by-products are potential agro-industrial residues of great value for extracting phenolic compounds with antioxidant activity. The MAE investigated in this study showed great potential as an eco-friendly extraction method for the valorization of this waste. Because of the complexity of the composition of the obtained ethanolic extracts, more research is needed to identify all the phenolic compounds extracted from this waste material by means of MAE, and to determine if the effect of the processing variables may affect the molecular nature and integrity of the phenolic compounds. As future trends, the use of green-based approaches could be massively employed to produce bioactive extracts from promissory agri-food biomasses, with the aim of generating biorefineries with cleaner and more efficient processes, incorporating sustainability concepts, integration and intensification of processes.

Results and Discussion

Figures 1 and 2 show the standardized Pareto charts for the response variables (a) TPC, (b) DPPH, and (c) FRAP of the ethanolic extracts from CBS and CPH, respectively.

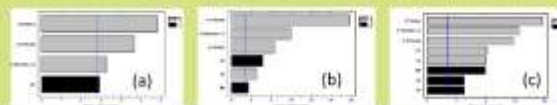


Figure 1. Pareto chart for the response variables (a) TPC, (b) DPPH y (c) FRAP of the ethanolic extracts from CBS.

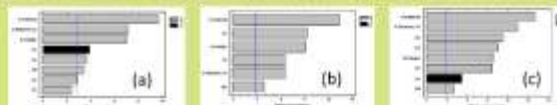


Figure 2. Pareto chart for the response variables (a) TPC, (b) DPPH y (c) FRAP of the ethanolic extracts from CPH.

Figures 3 and 4 show the response surfaces of the effects of the operating MAE variables on the TPC, DPPH, and FRAP of the ethanolic extracts from CBS and CPH, respectively.

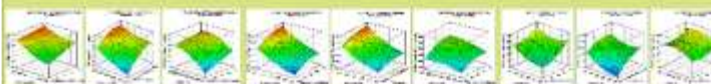


Figure 3. Response surfaces of the effects of the operating MAE variables on the TPC, DPPH, and FRAP of the ethanolic extracts from CBS.

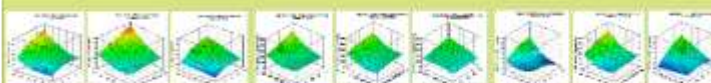


Figure 4. Response surfaces of the effects of the operating MAE variables on the TPC, DPPH, and FRAP of the ethanolic extracts from CPH.

Table 1. Optimal conditions for MAE of phenolic compounds with antioxidant activity from cocoa processing by-products from the Department of Nariño.

Cocoa processing by-product	Optimal MAE operating conditions for obtaining phenolic compounds with antioxidant activity		
	Microwave power (W)	Extraction time (s)	Solvent to solid ratio (mL/g)
CBS	400	224.11	70
CPH	394.4	240	70

References

- [1] Sánchez-Reinoso et al. *Chem Eng Process*, 153 (2020) 907922.
- [2] Sánchez-Camargo et al. *LWT - Food Sci Technol*, 137 (2021) 110414.
- [3] Chemat et al. *Green Chem*, 22(8) (2020), 2325–2353.
- [4] Mellinas et al. *LWT - Food Sci Technol*, 127 (2020) 109161.

Acknowledgments

This work was supported by the Universidad Nacional de Colombia and Agrosavia. The authors thank to all the staff of Agrosavia that collected and processed the cocoa fruits and beans for obtaining the by-products, especially to Dr. María Cristina García for coordinating those activities.

Certificado asistencia



VICEDECANATURA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
SEDE MANIZALES

CERTIFICAN QUE

Martha Cecilia Rincón Soledad

ASISTIÓ AL EVENTO

**V CONGRESO INTERNACIONAL EN INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN
INGENIERÍA, CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS- IICTA 2021**

Aprobado según Resolución 0854 de 30/07/2021 de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura

REALIZADO DEL 13 AL 15 DE OCTUBRE DE 2021 – MODALIDAD ONLINE
CON UNA INTENSIDAD DE 8 HORAS DIARIAS

MANIZALES, 15 DE OCTUBRE DE 2021

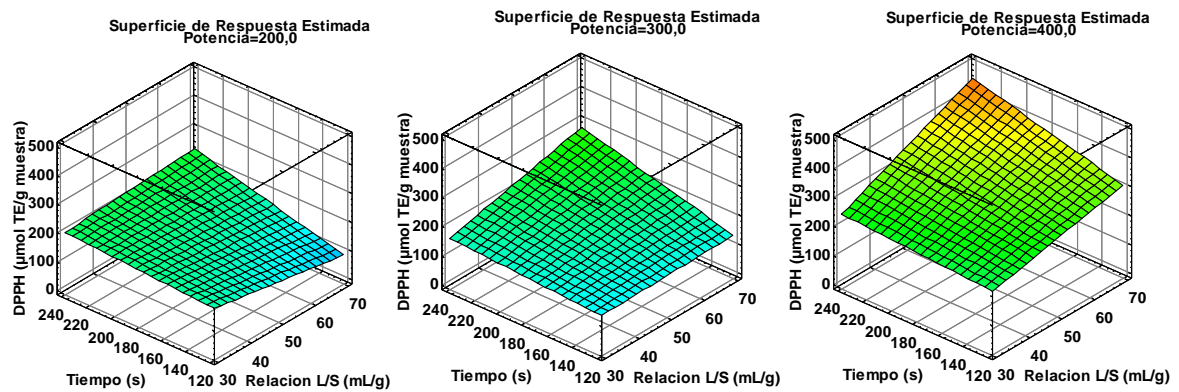
SANTIAGO RUEZ HERRERA
DECANO
FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES

CARLOS EDUARDO ORREGO ALZATE
DIRECTOR IICTA 2021
PROFESOR TITULAR
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE MANIZALES

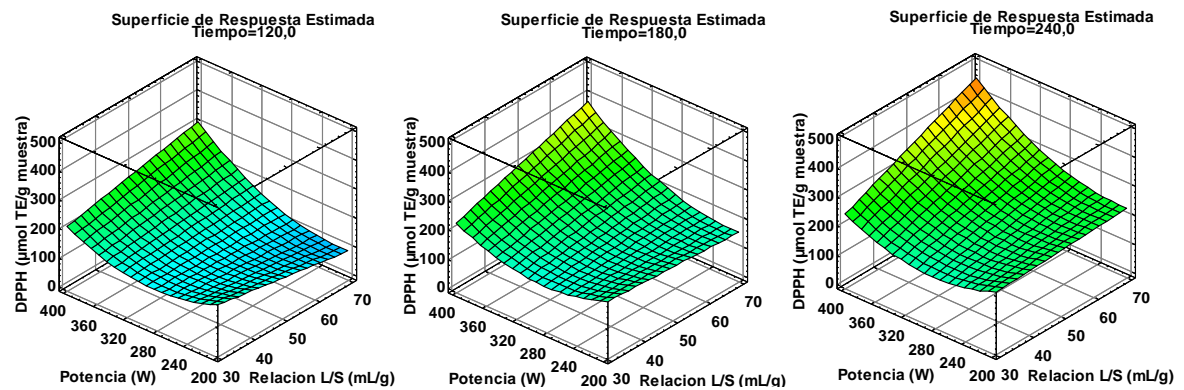
B. Anexo: Complemento

A continuación, se presentan todas las gráficas de superficies de respuesta obtenidas para Cacota y Cascarilla respectivamente.

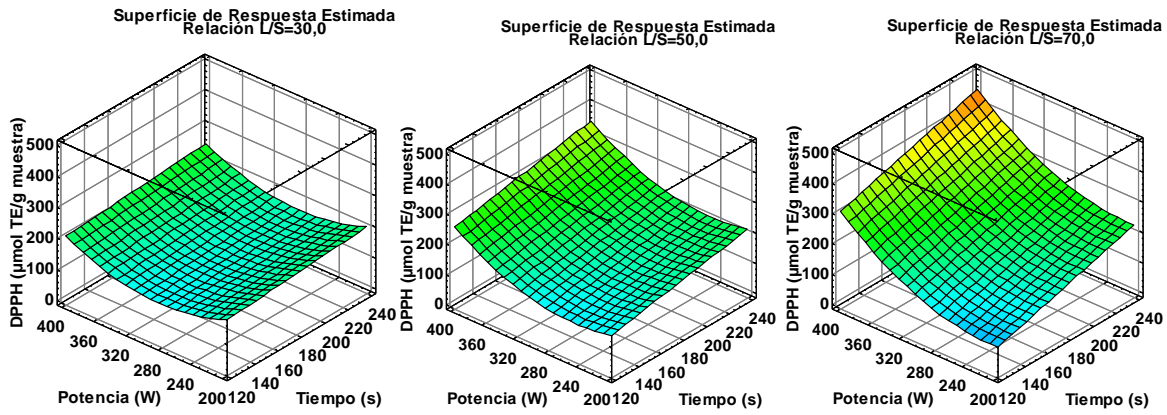
Superficie de respuesta Cacota: tiempo vs Relación L/S para DPPH



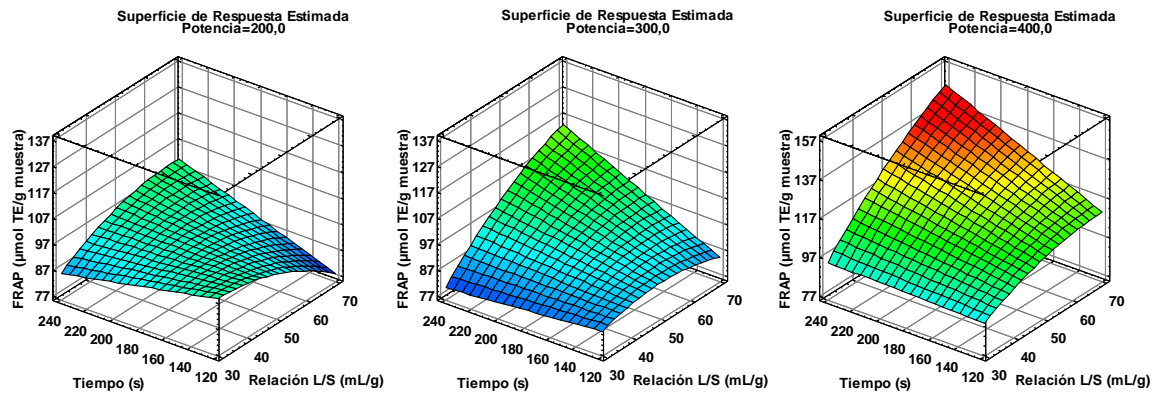
Superficie de respuesta Cacota: potencia vs Relación L/S para DPPH



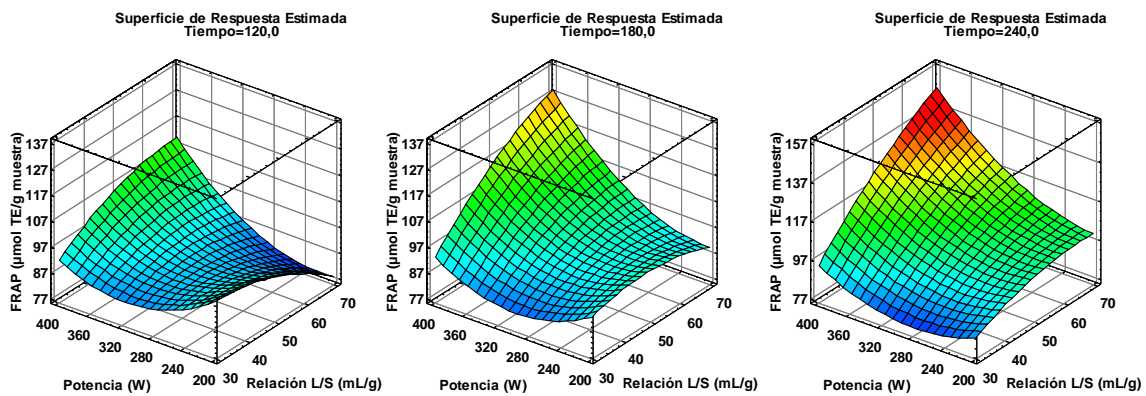
Superficie de respuesta Cacota: potencia vs tiempo para DPPH



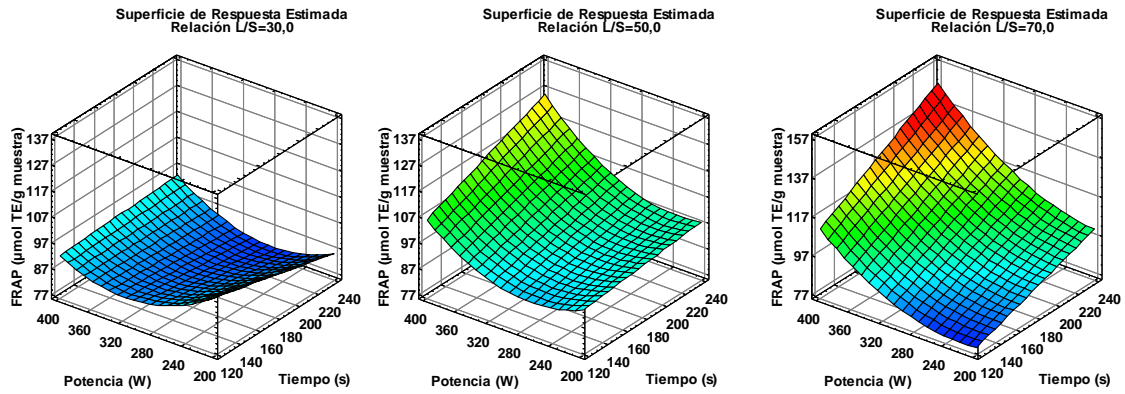
Superficie de respuesta Cacota: tiempo vs Relación L/S para FRAP



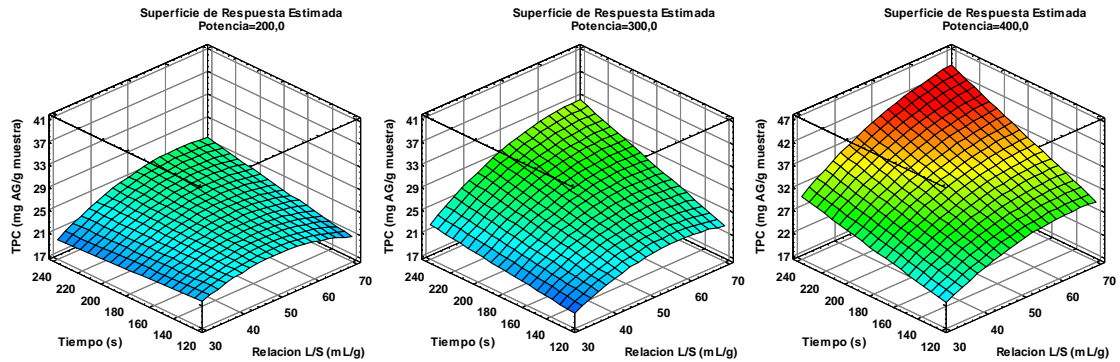
Superficie de respuesta Cacota: potencia vs Relación L/S para FRAP



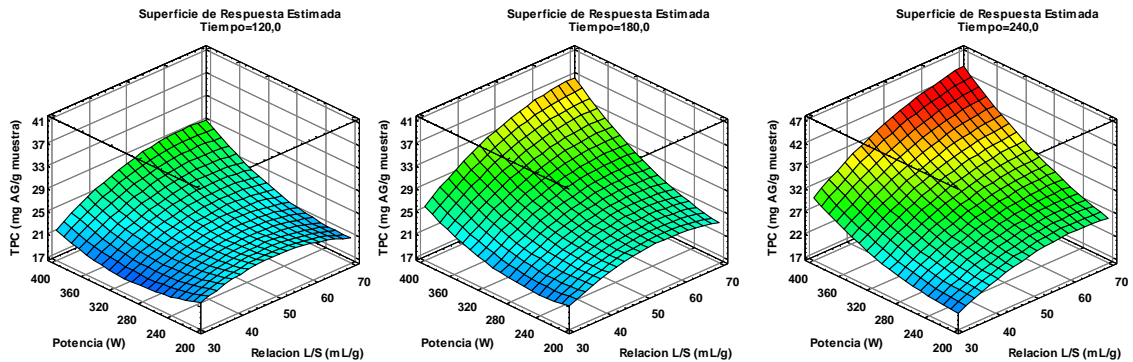
Superficie de respuesta Cacota: potencia vs tiempo para FRAP



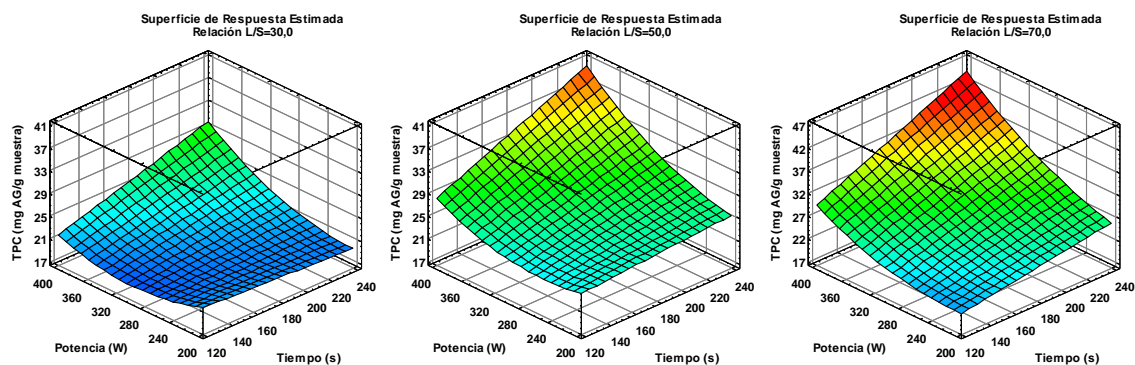
Superficie de respuesta Cacota: tiempo vs Relación L/S para TPC



Superficie de respuesta Cacota: potencia vs Relación L/S para TPC

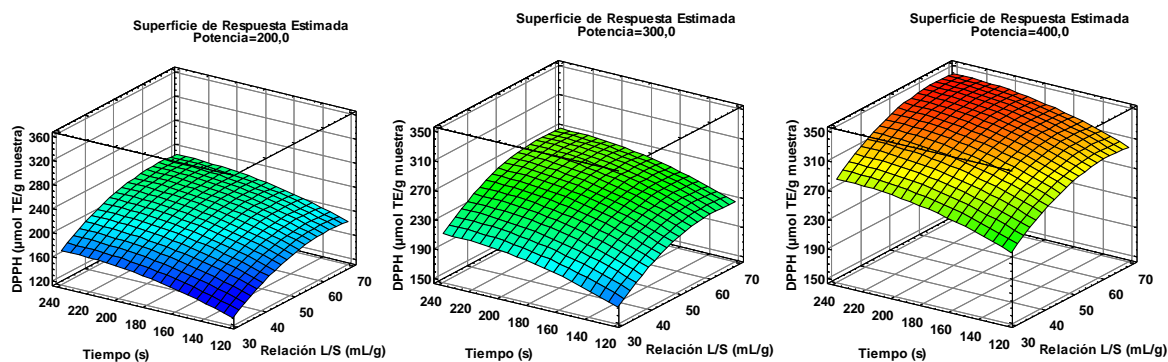


Superficie de respuesta Cacota: potencia vs tiempo para TPC

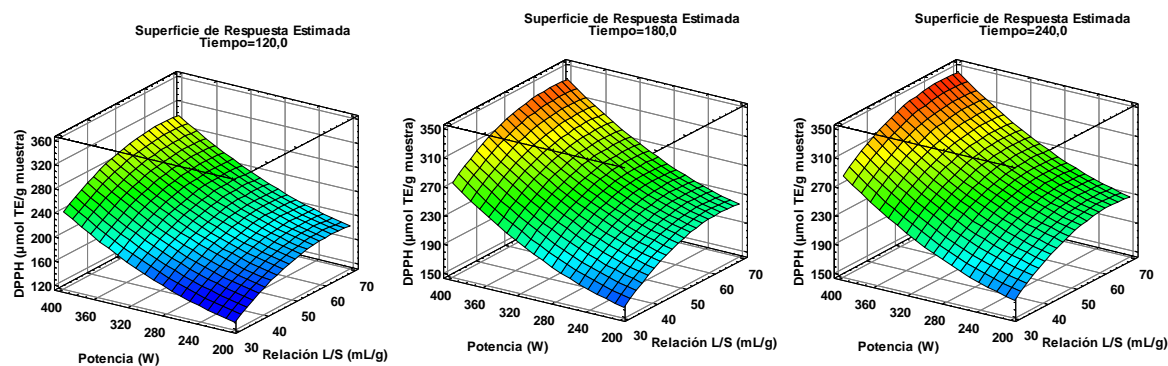


Cascarilla

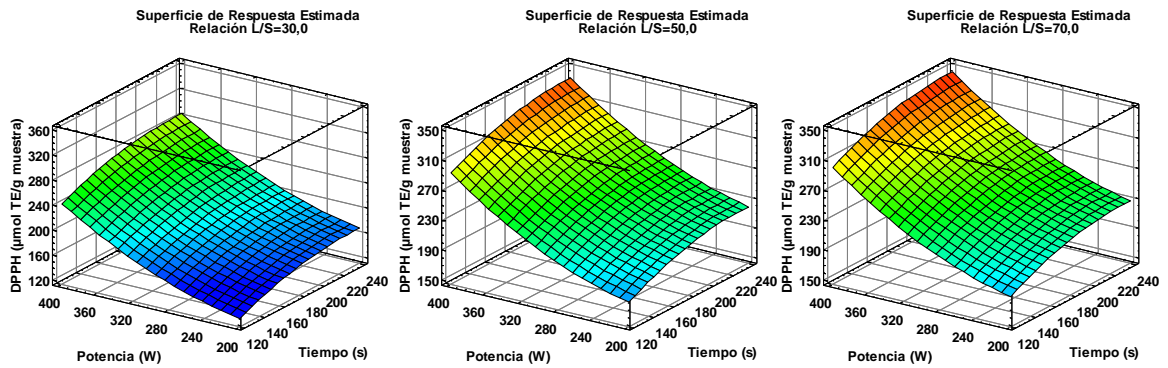
Superficie de respuesta Cascarilla: tiempo vs Relación L/S para DPPH



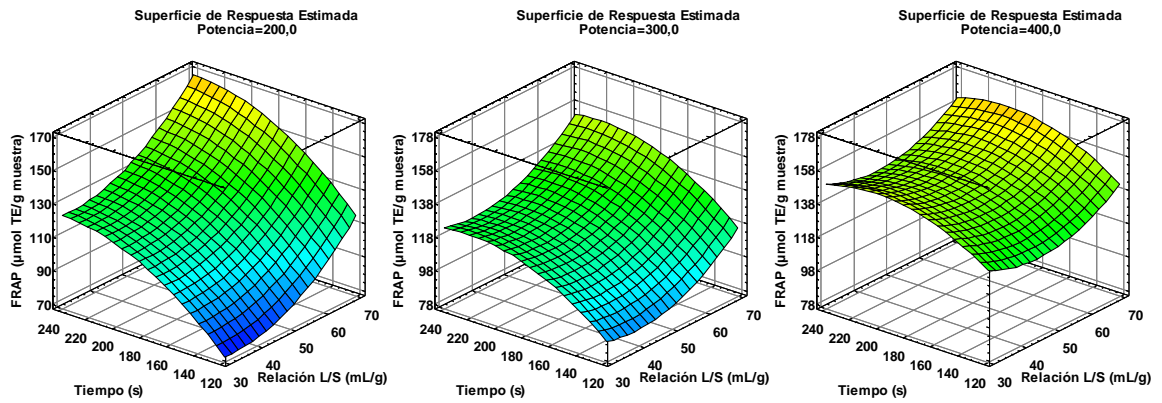
Superficie de respuesta Cascarilla: potencia vs Relación L/S para DPPH



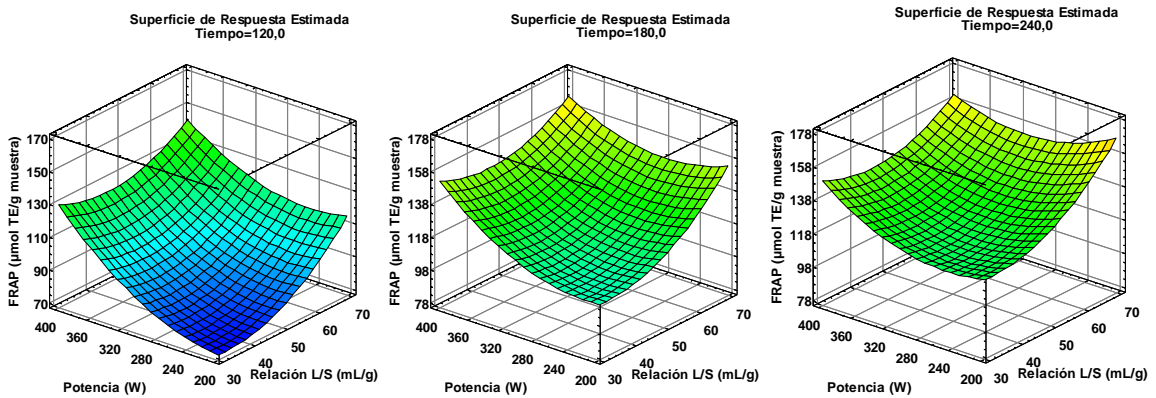
Superficie de respuesta Cascarilla: potencia vs tiempo para DPPH



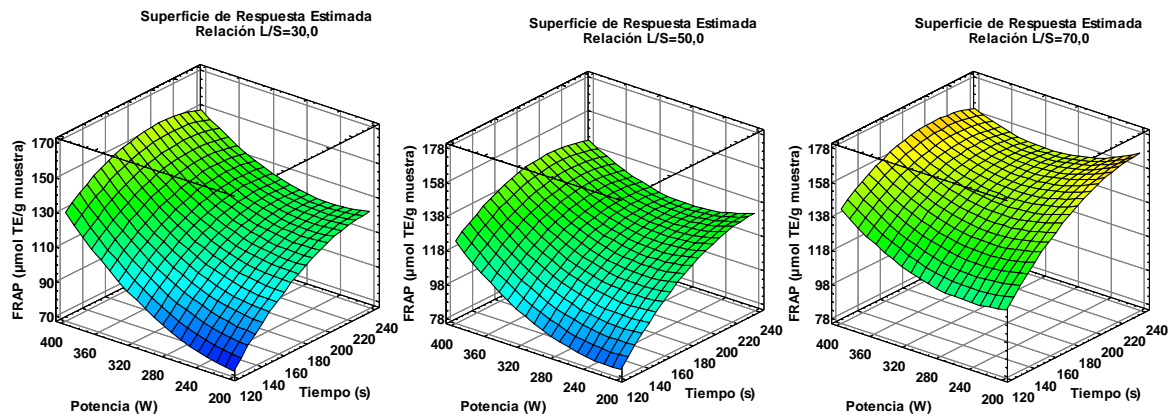
Superficie de respuesta Cascarilla: tiempo vs Relación L/S para FRAP



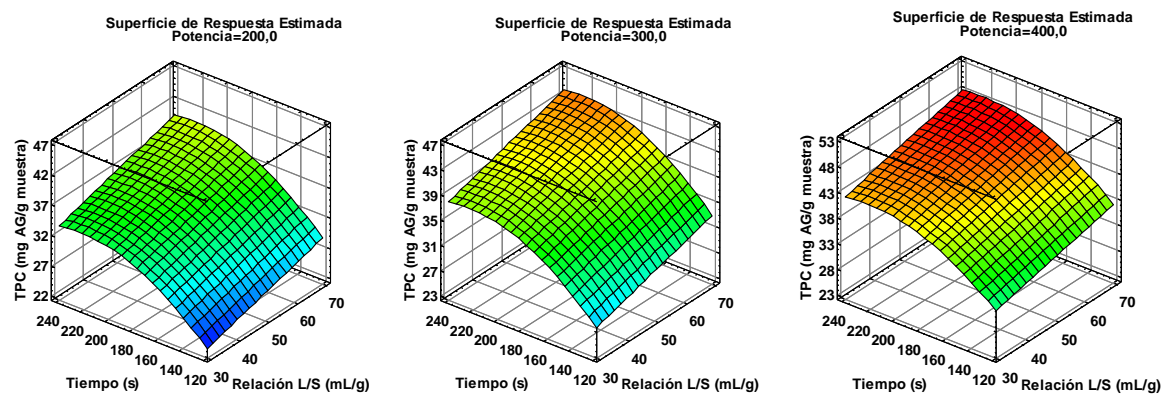
Superficie de respuesta Cascarilla: potencia vs Relación L/S para FRAP



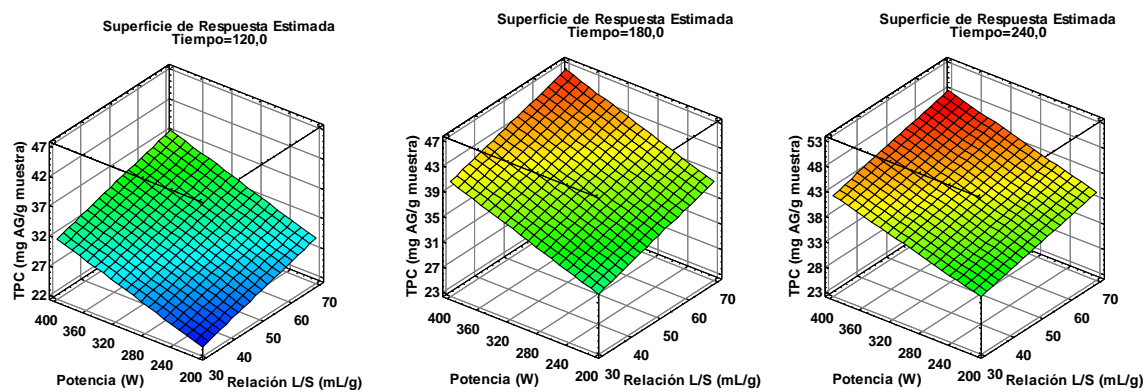
Superficie de respuesta Cascarilla: potencia vs tiempo para FRAP



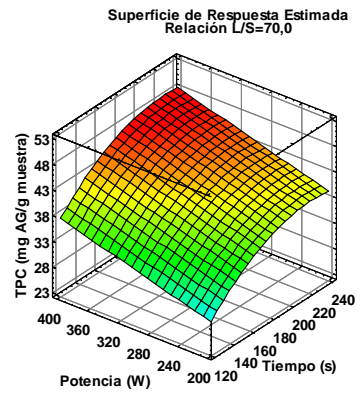
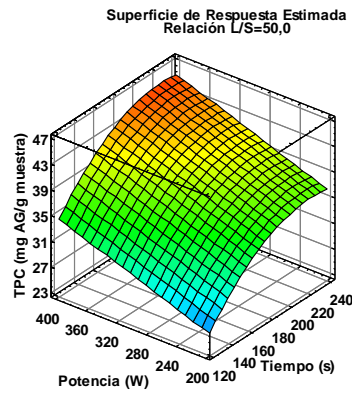
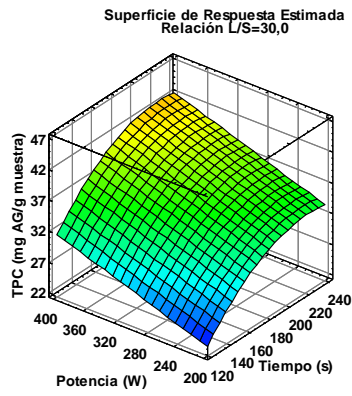
Superficie de respuesta Cascarilla: tiempo vs Relación L/S para TPC



Superficie de respuesta Cascarilla: potencia vs Relación L/S para TPC



Superficie de respuesta Cascarilla: potencia vs tiempo para TPC



Bibliografía

- Adebo, O. A., & Medina-Meza, I. G. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040927>
- Afoakwa O.E., Quao J., Takrama J., Budu A. & Saalia F. (2011). Chemical composition and physical quality characteristics of Ghanaian cocoa beans as affected by pulp pre-conditioning and fermentation. *Journal of Food and Science Technology* 50(6):1097-1105.
- Agudelo, C., Bravo, K., Ramírez-Atehortúa, A., Torres, D., Osorio, E., & Carrillo-Hormaza, L. (2021). Chemical and skincare property characterization of the main cocoa byproducts: Extraction optimization by rsm approach for development of sustainable ingredients. *Molecules*, 26(24). <https://doi.org/10.3390/molecules26247429>
- Alonso-Salces, R. M., Korta, E., Barranco, A., Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (2001). Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *Journal of Chromatography A*, 933(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01212-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01212-2)
- Arcos Campues, M.L. (2022). Biosorción de iones Cd (II) en solución acuosa por biocarbón obtenido a partir de cáscara de Theobroma cacao. [Trabajo de titulación modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Ingeniero Ambiental]. UCE.
- Atjanasuppat, K., Wongkham, W., Meepowpan, P., Kittakoop, P., Sobhon, P., Bartlett, A., & Whitfield, P. J. (2009). In vitro screening for anthelmintic and antitumour activity of ethnomedicinal plants from Thailand. *Journal of Ethnopharmacology*, 123(3). <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.010>

- Baharum, Z., Akim, A. M., Taufiq-Yap, Y. H., Hamid, R. A., & Kasran, R. (2014). In vitro antioxidant and antiproliferative activities of methanolic plant part extracts of *Theobroma cacao*. *Molecules*, *19*(11). <https://doi.org/10.3390/molecules191118317>
- Barbosa-Pereira, L., Belviso, S., Ferrocino, I., Rojo-Poveda, O., & Zeppa, G. (2021). Characterization and classification of cocoa bean shells from different regions of venezuela using hplc-pda-ms/ms and spectrophotometric techniques coupled to chemometric analysis. *Foods*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/foods10081791>
- Barbosa-Pereira, L., Guglielmetti, A., & Zeppa, G. (2018). Pulsed Electric Field Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Cocoa Bean Shell and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, *11*(4), 818–835. <https://doi.org/10.1007/s11947-017-2045-6>
- Beckett, S. T. (2008). *Science of Chocolate*. Cambridge-Reino Unido: The Royal Society of Chemistry.
- Beckett, Stephen T. (2009). *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition*. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition (4th ed.)*. <https://doi.org/10.1002/9781444301588>.
- Bermúdez-Menéndez, J.M. (2017). Extracción asistida com microondas. En Menéndez, J.A., Moreno, A.H. (Eds.). (2017). *Aplicaciones industriales del calentamiento con energía microondas*. Latacunga, Ecuador: Editorial Universidad Técnica de Cotopaxi, Primera Edición, pp 315. ISBN: 978-9978- 395-34-9
- Bernal Cedillo, T. M. (2021). *Revalorización de residuos de la Industria de Chocolate para la obtención de biomoléculas de interés industrial a partir de la cascarilla de cacao*. 14-15.
- Botella-Martínez, C., Lucas-Gonzalez, R., Ballester-Costa, C., Pérez-álvarez, J. Á., Fernández-López, J., Delgado-Ospina, J., Chaves-López, C., & Viuda-Martos, M. (2021). Ghanaian cocoa (*Theobroma cacao* L.) bean shells coproducts: Effect of particle size on chemical composition, bioactive compound content and antioxidant activity. *Agronomy*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/agronomy11020401>

- Botero, N., Londoño, L. v, & Rojas, L. F. (2016). Extracción de polifenoles totales asistida por enzimas, a partir de residuos de la industria del cacao. *Agronomía Colombiana*, 34(1).
- Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4). <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>
- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 81(September), 172–184. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>
- Cancer Today. 2022. <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Cantele, C., Rojo-Poveda, O., Bertolino, M., Ghirardello, D., Cardenia, V., Barbosa-Pereira, L., & Zeppa, G. (2020). In vitro bioaccessibility and functional properties of phenolic compounds from enriched beverages based on cocoa bean shell. *Foods*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/FOODS9060715>
- Castañeda, S. J., Rodríguez, C. J., & Lugo, C. E. (2016). Análisis del perfil de compuestos volátiles de cacao criollo (*Theobroma cacao* L.) durante el proceso de fermentación y secado por componentes principales (p. 8).
- Castillo, E., Alvarez, C., & Contreras, Y. (2018). Caracterización fisicoquímica de la cáscara del fruto de un clon de cacao (*theobroma cacao* L.) Cosechados en Caucagua, estado Miranda. Venezuela. *Revista de Investigación*, 42(95), 154–176. Retrieved from <https://www.redalyc.org/jatsRepo/3761/376160247008/376160247008.pdf>
- Chemat, F., Abert Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Nutrizio, M., Režek Jambrak, A., Munekata, P. E. S., ... Cravotto, G. (2020). A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. *Green Chemistry*, 22(8), 2325–2353. <https://doi.org/10.1039/c9gc03878g>
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products:

- Concept and principles. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 13, Número 7). <https://doi.org/10.3390/ijms13078615>
- Chun, K. S., Husseinsyah, S., & Osman, H. (2014). Development of biocomposites from Cocoa pod husk and Polypropylene: Effect of filler content and 3-aminopropyltriethoxysilane. *Polymers from Renewable Resources*, 5(4), 139–156. <https://doi.org/10.1177/204124791400500401>
- Chun, K. S., Husseinsyah, S., & Yeng, C. M. (2016). Effect of green coupling agent from waste oil fatty acid on the properties of polypropylene/cocoa pod husk composites. *Polymer Bulletin*, 73(12), 3465–3484.
- Cinar, Z. Ö., Atanassova, M., Tumer, T. B., Caruso, G., Antika, G., Sharma, S., Sharifi-Rad, J., & Pezzani, R. (2021). Cocoa and cocoa bean shells role in human health: An updated review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103(January). <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104115>
- Ciprián, M., (2020). Aplicación de la cáscara del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) como fuente de flavonoides en productos a base de cereales: Revisión de literatura. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano Honduras. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/a1c5bf9b-bd4c-4e23-99b9-3acdcec8fab9/content>
- Coelho MS, Fernandes SS, Salas-Mellado M de las M. (2019). Association Between Diet, Health, and the Presence of Bioactive Compounds in Foods. *Bioactive Compounds*. 159-183 p.
- Compañía Nacional de Chocolates S.A.S. (2019). COSECHA, BENEFICIO Y CALIDAD DEL GRANO DE CACAO (*Theobroma cacao* L.). <https://chocolates.com.co/wp-content/uploads/2020/06/Cartilla-Cosecha-Benef-Calidad-SEP-2019.pdf>
- Contreras, W. G. (2016). Validación de la determinación de los ácidos fenólicos presente en la infusión de cascarilla de la semilla de cacao (*Theobroma cacao*) por el equipo de electroforesis capilar. *IOSR Journal of Economics and Finance*, 3(1).
- Csiktusnádi Kiss, G. A., Forgács, E., Cserhádi, T., Mota, T., Morais, H., & Ramos, A. (2000).

- Optimisation of the microwave-assisted extraction of pigments from paprika (*Capsicum annum* L.) powders. *Journal of Chromatography A*, 889(1-2). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00440-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00440-4)
- Cuéllar, O. G., Quím, T., & Gloria Guerrero, A. (2012). Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao, *Theobroma cacao* L. *Revista MVZ Cordoba*, 17(3), 3176–3183. <https://doi.org/10.21897/rmvz.218>
- Dang, Y. K. T., & Nguyen, H. V. H. (2019). Effects of Maturity at Harvest and Fermentation Conditions on Bioactive Compounds of Cocoa Beans. *Plant Foods for Human Nutrition*, 74(1). <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0700-3>
- Delgado-Ospina, J., Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. Á., Martuscelli, M., & Chaves-López, C. (2021). Bioactive compounds and techno-functional properties of high-fiber co-products of the cacao agro-industrial chain. *Heliyon*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06799>
- Dewi, S. R., Stevens, L., Irvine, D., & Ferrari, R. (2021). Microwave-assisted extraction of Phenolic from cacao pod husks -an alternative for valorisation Microwave-Assited extraction of Phenolic from cacao pod husks - an alternative for valorisation. Conference: 18th International Conference on Microwave and High-Frequency Applications: AMPERE 2021At: Gothenburg, Sweden, 1(November). <https://doi.org/10.5281/zenodo.5645566>
- Díaz, R. O., & Hernández, M. S. (2020). Theobromas from the Colombian Amazon: A healthy alternative. *Informacion Tecnologica*, 31(2), 3–10. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642020000200003>.
- Di Mattia CD, Sacchetti G, Mastrocola D, Serafini M. 2017. From Cocoa to Chocolate: The Impact of Processing on In Vitro Antioxidant Activity and the Effects of Chocolate on Antioxidant Markers In Vivo. *Front Immunol*. 8. eng.
- Dircks, H. D. (2009). Investigation into the fermentation of Australian cocoa beans and its effect on microbiology, chemistry and flavour. The University of New South Wales, Australia.

- Domínguez-Pérez, L. A., Lagunes-Gálvez, L. M., Barajas-Fernández, J., Olán-Acosta, M. de los Á., García-Alamilla, R., & García-Alamill1, P. (2019). *Vibrational characterization of functional groups in cocoa beans during roasting with Fourier transform infrared spectroscopy*. 17.
- Dos Anjos Lopes, S. M., Martins, M. V., de Souza, V. B., & Tulini, F. L. (2021). Evaluation of the Nutritional Composition of Cocoa Bean Shell Waste (*Theobroma cacao*) and Application in the Production of a Phenolic-rich Iced Tea. *Journal of Culinary Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/15428052.2021.2016531>
- ElKhorri, S., Paré, J. R. J., Bélanger, J. M. R., & Pérez, E. (2007). The microwave-assisted process (MAPTM1): Extraction and determination of fat from cocoa powder and cocoa nibs. *Journal of Food Engineering*, 79(3). <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.089>
- Fedecacao, 2021. Un año difícil, pero con aprendizaje y buenas noticias. Periódico de Fedecacao Fondo Nacional del Cacao - No. 57
- Fedecacao, 2020. Federación Nacional de Cacaoteros El Cacaocultor es lo Primero Economía Internacional. Available online: <https://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/2015-02-12-17-20-59/nacionales> (acceso octubre 2020).
- Fitri, E., Effendi., Azra, A. (2021). Utilization of Dry Cocoa Pod Husks as an Antioxidant-Rich Herbal Drink. *Eksakta: Berkala Ilmiah Bidang MIPA*, 22(02), 102–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.24036//eksakta/vol21-iss2/262>
- Flórez-Montes, A. F. Rojas-González, S. Rodríguez-Barona. 2021 “Evaluation of Extracts Obtained from Fruit Wastes Using Different Methods”, *Ingeniería*, Vol. 26, Num. 1, (2021).
- García Arciniegas, M & Ochoa Pineda, J. (2017). *Caracterización y evaluación de citotoxicidad de hidrogeles para potencial uso como adhesivo óseo*. Universidad de los Andes.
- García, D., Sotero, V., Mancini, D., Torres, R. P., & Filho, J. (2011). Evaluación de la

- actividad antioxidante “In vivo” de tres frutos de la amazonía: *Gustavia augusta* L., *Grias neuberthii* Macbr y *Theobroma bicolor*. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 77(1), 44–55.
- Giralda Herguedas, C. (2017). Estudio experimental de la extracción de polifenoles de alperujo de aceituna por extracción asistida con microondas [Máster en Ingeniería Industrial, universidad de Valladolid]. Repositorio institucional Universidad de Valladolid <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/25808>
- Grillo, G., Boffa, L., Binello, A., Mantegna, S., Cravotto, G., Chemat, F., Dizhbite, T., Lauberte, L., & Telysheva, G. (2019). Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International*, 115, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.08.057>
- Gómez-García, F. J., López, A. L., Guerrero-Sánchez, Y., Siles, M. S., Díaz, F. M., & Alonso, F. C. (2020). Chemopreventive effect of pomegranate and cocoa extracts on ultraviolet radiation-induced photocarcinogenesis in SKH-1 mice. *PLoS ONE*, 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232009>
- Gutiérrez, G. A & López, B, J. (2018). Aprovechamiento gastronomico de la cascara del cacao. [http:// bibliotecavirtualoducal.uc.cl:8081/handle/123456789/1604993](http://bibliotecavirtualoducal.uc.cl:8081/handle/123456789/1604993)
- Hansen, P. E., & Spanget-Larsen, J. (2003). NMR and IR Spectroscopy of Phenols. In Z. Rappoport (Ed.), *The Chemistry of Phenols* (pp. 333-393). Wiley.
- Herrera Ardila, Y. (2013). *Microencapsulación de compuestos con poder antioxidante extraídos a partir de semillas sin fermentar de Theobroma cacao y Theobroma grandiflorum*.
- Herrera F & Castro H. (2016). Obtención de antioxidantes a partir del epicarpio de café (*coffea arabica* L.) empleando fluidos presurizados, una alternativa de aprovechamiento para este residuo agroindustrial. Tesis de grado. [Internet]. Bogotá. Available from: <https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/10362>
- Herrera-Rengifo JD, Villa-Prieto L, Olaya-Cabrera AC, García-Alzate LS. (2020).

- Extracción de almidón de cáscara de cacao *Theobroma cacao* L. como alternativa de bioprospección.. rev. ion. 2020;33(2):25-34. doi:10.18273/revion.v33n2-2020002
- Hernández, C. (2018). Análisis de la composición química del cacao, extracción y estudio de compuestos antioxidantes en genotipos del banco de germoplasma de México. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla
- Hernández, J. (2015). *ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas "Obtención a escala laboratorio de polifenoles a partir de la cáscara de cacao y su utilidad como aditivo conservante de aceites vegetales comestibles"*.
- Hernández Hernández, C. (2018). *Análisis de la composición química del cacao, extracción y estudio de compuestos antioxidantes en genotipos del banco de germoplasma de México*. 1-124. <https://idus.us.es/handle/11441/82298>
- Hu, Q., He, Y., Wang, F., Wu, J., Ci, Z., Chen, L., Xu, R., Yang, M., Lin, J., Han, L., & Zhang, D. (2021). Microwave technology: a novel approach to the transformation of natural metabolites. En *Chinese Medicine (United Kingdom)* (Vol. 16, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13020-021-00500-8>
- Ibrahim, N. H., Mahmud, M. S., & Nurdin, S. (2020). Microwave-assisted extraction of β -sitosterol from cocoa shell waste. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 991(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/991/1/012106>
- ICCO, 2021. International Cacao Organization. Available online: <https://www.icco.org/about-cacao/chocolate-industry.html> (access September 2021).
- ICCO, 2022. International Cacao Organization. Available online: <https://www.icco.org/about-cacao/chocolate-industry.html> (access October 2022).
- International Agency for Research on Cancer. 2022. <https://www.iarc.who.int/cancer-topics/>
- ITC, 2022. List of exporters for product: 1802 Cocoa shells, husks, skins and other cocoa waste. Available online: Trade Map. https://www.trademap.org/Country_SelProduct_TS.aspx?nvpm=1%7C%7C%7C%7C%7C1802%7C%7C%7C4%7C1

- % 7C1%7C2%7C2%7C1%7C2%7C1%7C1%7C1 (acceso septiembre 2022).
- Jakovljević, M., Jokić, S., Ačkar, Đ., Molar, M., Miškulin, M., & Palović, N. (2019). Green extraction techniques of bioactive components from cocoa shell. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 11–20. <https://doi.org/10.17508/cjfst.2019.11.1.02>
- Jinap, M. S., Jamilah, B., & Nazamid, S. (2004). Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. *Food Chemistry*, 85(1). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.06.005>
- Jokić, S., Gagić, T., Knez, E., Ubarić, D., & Kerget, M. (2018). Separation of active compounds from food by-product (Cocoa Shell) using subcritical water extraction. *Molecules*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061408>
- Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(2), 105-113. <https://doi.org/10.1002/pca.631>
- Kayaputri, I. L., Sumanti, D. M., Djali, M., Indiarto, R., & Dewi, D. L. (2014). KAJIAN FITOKIMIA EKSTRAK KULIT BIJI KAKAO (*Theobroma cacao* L.). *Chimica et Natura Acta*, 2(1), 83–90. <https://doi.org/10.24198/cna.v2.n1.9140>
- Ki, W. L., Hwang, E. S., Nam, J. K., Kyoung, H. K., & Hyong, J. L. (2005). Extraction and chromatographic separation of anticarcinogenic fractions from cacao bean husk. *BioFactors*, 23(3). <https://doi.org/10.1002/biof.5520230303>
- Kumar, R. C., Benal, M. M., Prasad, B. D., Krupashankara, M. S., Kulkarni, R. S., & Siddaligaswamy, N. H. (2018). Microwave assisted extraction of oil from pongamia pinnata seeds. *Materials Today: Proceedings*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.01.094>
- Kumar, S. P. J., Garlapati, V. K., Gujjala, L. K. S., & Banerjee, R. (2021). Technologies for oil extraction from oilseeds and oleaginous microbes. En *Three Phase Partitioning: Applications in Separation and Purification of Biological Molecules and Natural*

Products. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824418-0.00011-4>

Lateef, A., Azeez, M. A., Asafa, T. B., Yekeen, T. A., Akinboro, A., Oladipo, I. C., ... Beukes, L. S. (2016). Cocoa pod husk extract-mediated biosynthesis of silver nanoparticles: its antimicrobial, antioxidant and larvicidal activities. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 6(2), 159–169. <https://doi.org/10.1007/s40097-016-0191-4>

LCCC. Liga Colombiana Contra el Cáncer. 2022. <https://www.ligacancercolombia.org/promocion-y-prevencion/>

Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., Goya, L., & Bravo, L. (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Food Chemistry*, 104(3), 948–954. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.054>

Lembong, E., Djali, M., & Utama, G. L. (2021). Antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) shell powder in fermentation and immersion treatments. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 69(4), 533–541. <https://doi.org/10.11118/actaun.2021.048>

Lock-Navarro, D. H. (2018). Potencial energético de los residuos de la cadena de valor del cacao (*Theobroma Cacao*) en la Región Madre de Dios. *Universidad Nacional Agraria La Molina*, 96. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3660>

Lu, F., Rodriguez-Garcia, J., Van Damme, I., Westwood, N. J., Shaw, L., Robinson, J. S., ... Charalampopoulos, D. (2018). Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 14, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>

Mariatti, F., Gunjević, V., Boffa, L., & Cravotto, G. (2021). Process intensification technologies for the recovery of valuable compounds from cocoa by-products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 68(January). <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102601>

Martínez, R., Torres, P., Meneses, M. A., Figueroa, J. G., Pérez-Álvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2012). Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa

- (Theobroma cacao L.) co-products. *Food Research International*, 49(1), 39–45.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.005>
- Mashuni, Hamid, F. H., Muzuni, Kadidae, L. O., Jahiding, M., Ahmad, L. O., & Saputra, D. (2020). The determination of total phenolic content of cocoa pod husk based on microwave-assisted extraction method. *AIP Conference Proceedings*, 2243(June).
<https://doi.org/10.1063/5.0001364>
- Mellinas, A. C., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2020). Optimization of microwave-assisted extraction of cocoa bean shell waste and evaluation of its antioxidant, physicochemical and functional properties. *Lwt*, 127(March), 109361.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109361>
- Mellinas, C., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2019). Microwave-assisted green synthesis and antioxidant activity of selenium nanoparticles using theobroma cacao l. bean shell extract. *Molecules*, 24(22). <https://doi.org/10.3390/molecules24224048>
- Menéndez, J.A. (2017). Introducción al calentamiento con microondas. En Menéndez, J.A., Moreno, A.H. (Eds.). (2017). Aplicaciones industriales del calentamiento con energía microondas. Latacunga, Ecuador: Editorial Universidad Técnica de Cotopaxi, Primera Edición, pp 315. ISBN: 978-9978- 395-34-9
- Meza-Sepúlveda, D. C., Castro, A. M., Zamora, A., Arboleda, J. W., Gallego, A. M., & Camargo-Rodríguez, A. v. (2021). Bio-based value chains potential in the management of cacao pod waste in colombia, a case study. *Agronomy*, 11(4), 1-17.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11040693>
- Ministerio de Salud y Protección Social- Instituto Nacional de Cancerología. Plan Decenal para el Control del Cáncer en Colombia. 2012-2021.
https://www.minsalud.gov.co/Documents/Plan-Decenal-Cancer/PlanDecenal_ControlCancer_2012-2021.pdf
- Miranda, P. M., Ganda, P. G. P., & Suhendra, L. (2020). Karakteristik Ekstrak Kulit Buah Kakao (Theobroma cacao L.) sebagai Sumber Antioksidan pada Perlakuan Konsentrasi Pelarut dan Ukuran Partikel. *Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*,

8(1), 28–38.

Molano, J. (2021). Uso de la cáscara de cacao como fuente primaria para la obtención de materiales aplicados a la ingeniería mediante el estudio de las propiedades mecánicas.

Motamayor, J. C., Lachenaud, P., da Silva e Mota, J. W., Loor, R., Kuhn, D. N., Brown, J. S., & Schnell, R. J. (2008). Geographic and genetic population differentiation of the Amazonian chocolate tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003311>

Muharja, M., Darmayanti, R. F., Palupi, B., Rahmawati, I., Fachri, B. A., Setiawan, F. A., ... Putri, D. K. Y. (2021). Optimization of microwave-assisted alkali pretreatment for enhancement of delignification process of cocoa pod husk. *Bulletin of Chemical Reaction Engineering & Catalysis*, 16(1). <https://doi.org/10.9767/BCREC.16.1.8872.31-43>

Murillo-Baca, S. M., Ponce-Rosas, F. C., & Huamán-Murillo, M. D. J. (2020). Características fisicoquímicas, compuestos bioactivos y contenido de minerales en la harina de cáscara del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.) Physicochemical characteristics, bioactive compounds and minerals content in cocoa fruit (*Theobroma cacao* L. Manglar, 17(1), 67–73.

Murillo, I. (2008). Evaluación De 2 Dietas Experimentales Con Diferentes Niveles De Cascarrilla De Cacao (*Theobroma Cacao* L.) En Las Fases De Crecimiento Y Acabado De Cuyes (*Cavia Porcellus* L.) De Raza Andina. Tesis de Ingeniero en Alimentos. Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil - Ecuador.

Nazaruddin, R., Seng, L. K., Hassan, O., & Said, M. (2006). Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma Cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Products*, 24(1). <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.03.013>

Nguyen, V. T., Le, M. D., Nguyen, T. T. T., Khong, T. T., Nguyen, V. H., Nguyen, H. N., ... Trang, T. S. (2020). Microwave-assisted extraction for optimizing saponin yield and antioxidant capacity from cacao pod husk (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Food*

- Processing and Preservation*, 45(2), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15134>
- Nguyen, V. T., Tran, A. X., & Le, V. A. T. (2021b). Microencapsulation of phenolic-enriched extract from cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.). *Powder Technology*, 386, 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.03.033>
- Nguyen, V. T., Tran, T. G., & Tran, N. Le. (2021a). Phytochemical compound yield and antioxidant activity of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.) as influenced by different dehydration conditions. *Drying Technology*, 0(0), 1–13. <https://doi.org/10.1080/07373937.2021.1913745>
- Nieto-Figueroa, K. H., Mendoza-García, N. V., Gaytán-Martínez, M., Wall-Medrano, A., Guadalupe Flavia Loarca-Piña, M., & Campos-Vega, R. (2020). Effect of drying methods on the gastrointestinal fate and bioactivity of phytochemicals from cocoa pod husk: In vitro and in silico approaches. *Food Research International*, 137. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109725>
- Nieto-Figueroa, K. H. (2019). Evaluación nutritiva, nutracéutica y funcional *in vitro* de la vaina de cacao (*Theobroma cacao* L.). Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro.
- Oke, E. O., Okolo, B. I., Adeyi, O., Adeyi, J. A., Otolorin, J. A., Nnabodo, D., Ude, C. J., Okhale, S. E., Adeyanju, J. A., Adeniyi, A. G., Eleanyan, E., & Agbai, S. O. (2022). Bioactive Extract Production from Citrullus Clocynthis Fruit via Microwave-Assisted Extraction: Experimental Optimization, Process Design and Economics with Uncertainty Quantification. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. <https://doi.org/10.1007/s12247-022-09676-4>
- Okiyama, D. C. G., Soares, I. D., Cuevas, M. S., Crevelin, E. J., Moraes, L. A. B., Melo, M. P., Oliveira, A. L., & Rodrigues, C. E. C. (2018). Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent. *Food Research International*, 114, 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.055>
- Oracz, J., Zyzewicz, D., & Nebesny, E. (2015). The Content of Polyphenolic Compounds in Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.), Depending on Variety, Growing Region, and

- Processing Operations: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(9), 1176–1192. doi.org/10.1080/10408398.2012.686934
- Ordoñez, E. S., Leon-Arevalo, A., Rivera-Rojas, H., & Vargas, E. (2019). Quantification of total polyphenols and antioxidant capacity in skins and seeds from cacao (*Theobroma cacao* L.), tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), grape (*Vitis Vinífera*) and uvilla (*Pourouma cecropiifolia*). *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 175–183. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.02.02>
- Orozco, C. S. (2020). Apoyo al mejoramiento del sistema productivo de la asociación ACEFUVER Universidad de Antioquia Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Bioquímica Chigorodó, Colombia.
- Ortiz-Rodríguez, L; Sandoval-Salas, F; Morales-Olán, G & Arcila-Lozano. (2022). Tecnologías Emergentes Aplicadas en Alimentos T-I. ECORFAN. https://www.researchgate.net/publication/362684051_Handbook_Tecnologias_Emergentes_Aplicadas_en_Alimentos
- Otálora-Orrego, D., & Martín G., D. A. (2020). Técnicas emergentes de extracción de β -caroteno para la valorización de subproductos agroindustriales de la zanahoria (*Daucus carota* L.): una revisión. *Informador Técnico*, 85(1). <https://doi.org/10.23850/22565035.2857>
- Pangestu, R., Amanah, S., Juanssilfero, A. B., Yopi, & Perwitasari, U. (2020). Response surface methodology for microwave-assisted extraction of pectin from cocoa pod husk (*Theobroma cacao*) mediated by oxalic acid. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 2126-2133. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00459-4>
- Pasquet, V., Chérouvrier, J. R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J. M., Bérard, J. B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J. P., & Picot, L. (2011). Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochemistry*, 46(1), 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.07.009>
- Pérez-Loredo, M. G., Jesús, L. H. De, & Barragán-Huerta, B. E. (2017). Extracción de compuestos bioactivos de pitaya roja (*Stenocereus stellatus*) aplicando pretratamientos con microondas, ultrasonido y enzimáticos. *Agrociencia*, 51(2).

- Puertas, M. A., Mosquera-Mosquera, N., & Rojano, B. (2016). Estudio de la capacidad antioxidante in vitro de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol) mediante extracción asistida por microondas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(1).
- Porto de Souza Vandenberghe, L., Kley Valladares-Diestra, K., Amaro Bittencourt, G., Fátima Murawski de Mello, A., Sarmiento Vásquez, Z., Zwiercheczewski de Oliveira, P., ... Ricardo Soccol, C. (2022). Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*, 344(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126252>
- Rachmawaty, Mu'Nisa, A., Hasri, Pagarra, H., & Hartati. (2019). Analysis of phenolic content and antioxidant activity of cocoa pod husk (*Theobroma cacao* L.). *Journal of Physics: Conference Series*, 1317(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1317/1/012087>
- Rahayu, P. P., Rosyidi, D., Purwadi, & Thohari, I. (2019). Characteristics of catechin extracted from cocoa husks using microwave assisted extraction (MAE). *Biodiversitas*, 20(12), 3626–3631. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201222>
- Rahmawati, I., Fachri, B. A., Manurung, Y. H., Nurtsulutsiyah, & Reza, M. (2021). Application of response surface methodology in optimization condition of anthocyanin extraction process of cocoa peel waste with Microwave Assisted Extraction Method (MAE). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 743(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/743/1/012091>
- Ramos, S., Salazar, M., Nascimento, L., Carazzolle, M., Pereira, G., Delforno, T., Nascimento, M., de Aleluia, T., Celeghini, R., & Efraim, P. (2020). Influence of pulp on the microbial diversity during cupuassu fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108465. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108465>
- Rebollo-Hernanz, M., Cañas, S., Taladrid, D., Segovia, Á., Bartolomé, B., Aguilera, Y., & Martín-Cabrejas, M. A. (2021). Extraction of phenolic compounds from cocoa shell: Modeling using response surface methodology and artificial neural networks. *Separation and Purification Technology*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118779>

- Reyes Melinao, C.E. (2021). Evaluación de métodos de extracción asistida por ultrasonido y microondas para la liberación de compuestos de interés desde pomasa de tomate deshidratada. [Agronomía Universidad de Talca Chile]. Repositorio Biblioteca Universidad de Talca <http://dspace.otalca.cl/handle/1950/12551>
- Rojas, L. M. (2019). Aprovechamiento de la cáscara de Cacao para la elaboración de un biocomposito con aplicación en la construcción sostenible. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12495/2817>.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Mateus-Reguengo, L., Bertolino, M., Stévigny, C., & Zeppa, G. (2019b). Effects of particle size and extraction methods on cocoa bean shell functional beverage. *Nutrients*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/nu11040867>
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Orden, D., Stévigny, C., Zeppa, G., & Bertolino, M. (2020a). Physical properties and consumer evaluation of cocoa bean shell-functionalized biscuits adapted for diabetic consumers by the replacement of sucrose with tagatose. *Foods*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/foods9060814>
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020b). Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>
- Rojo-Poveda, O., Oliveira Ribeiro, S., Anton-Sales, C., Keymeulen, F., Barbosa-Pereira, L., Delporte, C., Zeppa, G., Stévigny, C., & Rojo-Poveda Student, O. (2019a). *Evaluation of Cocoa Bean Shell Antimicrobial Activity: a Tentative Assay Using a Metabolomic Approach for Active Compound Identification*.
- Rojo-Poveda, O., Zeppa, G., Ferrocino, I., Stévigny, C., & Barbosa-Pereira, L. (2021). Chemometric classification of cocoa bean shells based on their polyphenolic profile determined by rp-hplc-pda analysis and spectrophotometric assays. *Antioxidants*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/antiox10101533>
- Rossin, D., Barbosa-Pereira, L., Iaia, N., Sottero, B., Danzero, A. C., Poli, G., Zeppa, G., & Biasi, F. (2021). Protective effect of cocoa bean shell against intestinal damage: An example of byproduct valorization. *Antioxidants*, 10(2), 1-18. <https://doi.org/10.3390/antiox10020280>

- Sánchez-Camargo, A. del P., Ballesteros-Vivas, D., Buelvas-Puello, L. M., Martínez-Correa, H. A., Parada-Alfonso, F., Cifuentes, A., ... Gutiérrez, L. F. (2021). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds with antioxidant and anti-proliferative activities from supercritical CO₂ pre-extracted mango peel as valorization strategy. *Lwt*, 137(June 2020). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110414>
- Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2011). Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6). <https://doi.org/10.1021/jf104574z>
- Sanchez-Reinoso, Z., Mora-Adames, W. I., Fuenmayor, C. A., Darghan-Contreras, A. E., Gardana, C., & Gutiérrez, L. F. (2020). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from Sacha Inchi shell: Optimization, physicochemical properties and evaluation of their antioxidant activity. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 153(May), 107922. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.107922>
- Sangronis, E., Soto, M. J., Valero, Y., & Buscema, I. (2014). Cascarrilla de cacao Venezolano como materia prima de infusiones. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 64(2), 123–130.
- Sarah, M., Hisham, M. F., Rizki, M., & Erwinda, R. (2020). Effect of power and time in pectin production from cocoa pod husk using microwave-assisted extraction technique. *International Journal of Renewable Energy Development*, 9(1). <https://doi.org/10.14710/ijred.9.1.123-130>
- Sarmiento Hernández, J. S. (2019) Evaluación del uso de la cáscara de cacao como sustituto parcial de la matriz polimérica en la obtención de espumas de poliuretano (Trabajo de grado). Fundación Universidad de América. Retrieved from <http://hdl.handle.net/20.500.11839/7406>
- Singh, A., Ahmad, S., & Ahmad, A. (2015). Green extraction methods and environmental applications of carotenoids-a review. En *RSC Advances* (Vol. 5, Número 77). <https://doi.org/10.1039/c5ra10243j>
- Singh, A. K., Rana, H. K., & Pandey, A. K. (2020). Analysis of chlorophylls. En *Recent*

- Advances in Natural Products Analysis*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00019-6>
- Siow, C. S., Chan, E. W. C., Wong, C. W., & Ng, C. W. (2022). Antioxidant and sensory evaluation of cocoa (*Theobroma cacao* L.) tea formulated with cocoa bean hull of different origins. *Future Foods*, 5. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2021.100108>
- Sládková, A., Benedeková, M., Stopka, J., Šurina, I., Ház, A., Stržincová, P., Čížová, K., Škulcová, A., Burčová, Z., Kreps, F., Šima, J., & Jablonský, M. (2016). PEER-REVIEWED BRIEF COMMUNICATION bioresources.com Yield of Polyphenolic Substances Extracted from Spruce (*Picea abies*) Bark by Microwave-Assisted Extraction. In *BioResources* (Vol. 11, Issue 4).
- Soares, T. F., & Oliveira, M. B. P. P. (2022). Cocoa By-Products: Characterization of Bioactive Compounds and Beneficial Health Effects. En *Molecules* (Vol. 27, Número 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27051625>
- Sotelo, L., Alvis, A., & Arrázola, G. (2015). Evaluation of epicatechin, theobromine and caffeine in cacao husks (*Theobroma cacao* L.), determination of the antioxidant capacity. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124–134. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2015v9i1.3751>
- Soto, M. (2012). Desarrollo Del Proceso De Producción De Cascarilla De Semilla De Cacao En Polvo Destinada Al Consumo Humano. 69. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/07/000155680.pdf>
- Soto Mora, J. E., & Roa, S. C. (2021). Artículo de Investigación Evaluación del comportamiento del color del vino artesanal de curuba “Son del Alba” Evaluation of the behavior of the color of the curuba artisan wine " Son del Alba ". *Revista Ingeniería y Región*, 26, 4–19. <https://doi.org/10.25054/22161325.2915>
- Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2014). Recovery of carotenoids from tomato processing by-products - A review. *Food Research International*, 65(PC). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.09.032>
- Sun, T., & Ho, C. T. (2001). Antiradical efficiency of tea components. *Journal of Food Lipids*,

- 8(3). <https://doi.org/10.1111/j.1745-4522.2001.tb00198.x>
- Tamrin, Faradilla, R. H. F., Ibrahim, M. N., Rejeki, S., Ufrianto, N., & Cahyani, D. R. (2020). Understanding the heat stability and solubility of cocoa bean shell extract as antioxidant and antibacterial functional ingredients. *International Food Research Journal*, 27(4), 660–665.
- Taparia, S. S., & Khanna, A. (2016). Procyanidin-rich extract of natural cocoa powder causes ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis and reduction of pro-MMP-2 in epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.06.019>
- Tapia, A. (2015). Cascarilla de cacao (*Theobroma cacao* L.) Variedad arriba y ccn51 para la elaboración de una infusión. *Facultad de Ingeniería, Carrera Alimentos.*, 143. http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/11981/1/AL_574.pdf
- Taşkın, B., & Aksoylu Özbek, Z. (2020). Optimisation of microwave effect on bioactives contents and colour attributes of aqueous green tea extracts by central composite design. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 2240–2252. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00471-8>
- Thu Dao, T. A., Webb, H. K., & Malherbe, F. (2021). Optimization of pectin extraction from fruit peels by response surface method: Conventional versus microwave-assisted heating. *Food Hydrocolloids*, 113(June 2020), 106475. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106475>
- Tiburcio, P. B. (2017). Solid-state fermentation of *Theobroma cacao* pod husk using *Rhizopus stolonifera* - prospection of biomolecules MSc. Thesis. Curitiba, Paraná, Brazil: Universidade Federal do Paraná.
- Umrigar, V., Chakraborty, M., & Parikh, P. A. (2022). Optimization of microwave-assisted esterification of succinic acid using Box-Behnken design approach. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22807-1>
- Utami, R. R., Jamilah, Wahyudi, R., Tangkin, W. P., Thamrin, I., Amalia, A. N., Indriana, D.,

- Rosniati, Yumas, M., Assa, A., & Ariyanti, M. (2021). Antioxidant activities of cocoa bean shell from North Luwu and Gunungkidul as an active compound of packaging material. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 743(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/743/1/012021>
- Utami, R. R., Supriyanto, S., Rahardjo, S., & Armunanto, R. (2017). Aktivitas Antioksidan Kulit Biji Kakao dari Hasil Penyangraian Biji Kakao Kering pada Derajat Ringan, Sedang dan Berat. *Agritech*, 37(1), 89. <https://doi.org/10.22146/agritech.10454>
- Valadez-Carmona, L., Plazola-Jacinto, C. P., Hernández-Ortega, M., Hernández-Navarro, M. D., Villarreal, F., Necochea-Mondragón, H., ... Ceballos-Reyes, G. (2017). Effects of microwaves, hot air and freeze-drying on the phenolic compounds, antioxidant capacity, enzyme activity and microstructure of cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41(April), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.04.012>
- Valadez-Carmona, Lourdes., Ortiz-Moreno, Alicia., Ceballos-Reyes, G., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2018). Valorization of cacao pod husk through supercritical fluid extraction of phenolic compounds. *The Journal of Supercritical Fluids*, 131(September 2017), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.09.011>
- Valbuena Coca, D. A., & Serrano Acevedo, C. A. (2018). Aprovechamiento De La Cascarrilla De Cacao Para La Generación De Un Producto Derivado En La Asociación De Productores Orgánicos Del Municipio De Dibulla (Apomd). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689-1699.
- Vaštyl, M., Jankovská, Z., Cruz, G. J. F., & Matějová, L. (2022). A case study on microwave pyrolysis of waste tyres and cocoa pod husk; effect on quantity and quality of utilizable products. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(1). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106917>
- Vázquez, A., Ovando, I., Adriano, L., Betancur, D., & Salvador, M. (2016). Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 66(3), 239–254.
- Villamizar Jaimes, Y. L., Rodríguez Guerrero, J. S., & León Castrillo, L. C. (2017).

- Caracterización fisicoquímica, microbiológica y funcional de harina de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) variedad CCN-51. *Cuaderno Activa*, 9.
- Villamizar, R., & López, J. (2017). Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra : simulación de una planta piloto para su extracción. *Respuestas*, 22(1), 75–83. Retrieved from <https://revistas.ufps.edu.co/index.php/respuestas/article/view/821/1677>
- Vriesmann, L. C., Amboni, R. D. M. C., & Petkowicz, C. L. O. (2011). Cacao pod husks (*Theobroma cacao* L.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1173–1181.
- Xiao, X., Han, L., Shi, B. (2008). Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragal*. *Separation and Purification Technology*, 2008, 62, 614-618.
- Yaakob, M. N. A., Roslan, R., Salim, N., Mustapha, S. N. H., Zakaria, S., Chia, C. H., Sajab, M. S., & Yuh, P. Y. N. (2020). Effect of temperature on the yield of lignin extracted using microwave-assisted acetosolv from empty fruit bunch fibers. En *Materials Science Forum: Vol. 981 MSF* (pp. 240-244). Trans Tech Publications Ltd. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.981.240>
- Yahya, M., Ginting, B., & Saidi, N. (2021). In-vitro screenings for biological and antioxidant activities of water extract from theobroma cacao I. Pod husk: Potential utilization in foods. *Molecules*, 26(22). <https://doi.org/10.3390/molecules26226915>
- Yamagishi, M., Natsume, M., Osakabe, N., Okazaki, K., Furukawa, F., Imazawa, T., Nishikawa, A., & Hirose, M. (2003). Chemoprevention of lung carcinogenesis by cacao liquor proanthocyanidins in a male rat multi-organ carcinogenesis model. *Cancer Letters*, 191(1). [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00629-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00629-8)
- Yapo, B. M., Besson, V., Koubala, B. B., & Koffi, K. L. (2013). Adding Value to Cacao Pod Husks as a Potential Antioxidant-Dietary Fiber Source. *American Journal of Food and Nutrition*, 1(3), 38–46. <https://doi.org/10.12691/ajfn-1-3-4>
- Yong, S. K., Leyom, J., Tay, C. C., & Talib, S. A. (2018). Sorption of lead from aqueous

system using cocoa pod husk biochar: Kinetic and isotherm studies. *International Journal of Engineering and Technology (UAE)*, 7(3), 241–244. <https://doi.org/10.14419/ijet.v7i3.11.16017>

Zamora, P. A., & Ochoa, G. L. (2020). Cadena Productiva del Cacao en Colombia. Un análisis del sector con enfoque de cadena.

Zavala Zavala, L., Castro de la Cruz, Y., Calva Angeles, F., Moralez Cruz, A., Sánchez Mundo, M. de la L., & Chávez Reyes, Y. (2020). Optimización de deshidratación de la semilla de mango con microondas y conservación de los compuestos fenólicos. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 7(1).

Zhang, Y., Li, Q., Xing, H., Lu, X., Zhao, L., Qu, K., & Bi, K. (2013). Evaluation of antioxidant activity of ten compounds in different tea samples by means of an on-line HPLC-DPPH assay. *Food Research International*, 53(2). <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.026>