

Extracción sostenible de compuestos bioactivos con actividad antioxidante a partir de un subproducto del procesado industrial de café



Martino López de Sancho Marín

Trabajo Fin de Máster

2025



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Se autoriza al alumno **D. Martino López de Sancho Marín**, a realizar el Trabajo Fin de Máster titulado: “Extracciones sostenibles de compuestos bioactivos con actividad antioxidante a partir de un subproducto del procesado industrial de café”, bajo la dirección de D^a. Aurelia Pérez Espinosa y D^a. Yolanda Aguilera Gutiérrez (Universidad Autónoma de Madrid), debiendo cumplir las normas establecidas para la redacción del mismo que están a su disposición en la página Web específica del Master.

Orihuela, 22 de julio de 2025

La Directora del Máster Universitario de Investigación en Gestión, Tratamiento y Valoración de Residuos Orgánicos

CONCEPCION | PAREDES | GIL
Firmado digitalmente por
CONCEPCION|PAREDES|GIL
Fecha: 2025.07.22 19:11:34
+02'00'

Fdo.: Concepción Paredes Gil

TRIBUNAL	
FECHA:	
PRESIDENTE:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:
VOCAL:	FIRMA:

Extracción sostenible de compuestos bioactivos con actividad antioxidante a partir de un subproducto del procesado industrial de café

Vº Bº Directora

Dª Aurelia Pérez Espinosa (UMH)

Tutora académica

Vº Bº Codirectora



Dª Yolanda Aguilera Gutiérrez (UAM)

Tutora profesional

Alumno

Martino López de Sancho Marín

REFERENCIAS DEL TRABAJO FIN DE MASTER

IDENTIFICACIONES

Autor: Martino López de Sancho Marín

Título: Extracción sostenibles de compuestos bioactivos con actividad antioxidante a partir de un subproducto del procesado industrial de café

Title: Sustainable extraction of bioactive compounds with antioxidant activity from a by-product of industrial coffee processing

Director/es del TFM: Aurelia Perez Espinosa (UMH) y Yolanda Aguilera Gutierrez (UAM)

Año: 2025

Titulación: Máster en Gestión, Tratamiento y Valorización de Residuos Orgánicos

Tipo de proyecto: Trabajo experimental

Palabras claves: subproducto, café, valorización, extracción sostenible, fraccionamiento, optimización, diseño de experimentos, DOE, análisis estadístico, ajuste de modelo, método de superficie de respuesta, RSM.

Keywords: byproduct, coffee, valorization, sustainable extraction, fractionation, optimization, design of experiments, DOE, statistical analysis, model fitting, response surface methodology, RSM.

Nº citas bibliográficas: 43

Nº de planos: -

Nº de tablas: 5

Nº de figuras: 9

Nº de anexos: -

RESUMEN

El café, por sus propiedades, es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo y como consecuencia, se trata de un sector que genera una gran cantidad de subproductos. La actual normativa europea y estatal establece una jerarquía para la gestión de subproductos con el objetivo de proteger y mejorar la salud humana y el medio ambiente. Una de las mejores alternativas para realizar la valorización de estos productos es la aplicación de métodos de extracción sostenibles.

El objetivo de este trabajo ha sido diseñar y optimizar un proceso sostenible de extracción y fraccionamiento de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de cascarilla de café (CSS), empleando la extracción asistida por calor (HAE) con agua como disolvente. Todo el trabajo se ha abordado desde la metodología del diseño de experimentos (DOE) con el fin de optimizar el número de ensayos, la calidad de los datos obtenidos y los recursos utilizados.

Los resultados experimentales (cuantificación de compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante) han permitido conocer que las mejores condiciones para la extracción se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de tiempo extracción, 84,8 °C de temperatura de extracción y una relación S/L de 0,0141 g/mL. Con estas condiciones, en las diferentes fracciones se ha obtenido un valor de compuestos fenólicos totales (mg GAE/g CSS) de 5,85-6,12 (fracción pura), 4,81-5,22 (fracción acuosa) y 0,87-1,08 (fracción orgánica); un valor de actividad antioxidante mediante el método FRAP ($\mu\text{mol Trolox/g CSS}$) de 29,24-31,22 (fracción pura), 21,78-25,16 (fracción acuosa) y 4,39-5,59 (fracción orgánica); y un valor de actividad antioxidante mediante el método ABTS (mg Trolox/g CSS) de 10,27-10,96 (fracción pura), 8,40-9,48 (fracción acuosa) y 2,46-2,76 (fracción orgánica). Estos datos indican un buen fraccionamiento y la concentración en cada fracción de los compuestos afines. Además, el análisis estadístico de los datos ha permitido conocer que las dos variables con una influencia altamente significativa sobre el proceso son la temperatura de extracción y la relación S/L.

Por tanto, se puede concluir que se ha logrado optimizar el proceso de extracción de un método sostenible que puede ser utilizado en la industria alimentaria.

ABSTRACT

Coffee, due to its properties, is one of the most consumed beverages worldwide and, as a consequence, it is a sector that generates a large amount of by-products. Current European and national regulations establish a hierarchy for the management of by-products with the aim of protecting and improving human health and the environment. One of the best alternatives for the valorization of these products is the application of sustainable extraction methods.

The objective of this work was to design and optimize a sustainable process for the extraction and fractionation of phenolic compounds with antioxidant activity from coffee silverskin (CSS), using heat-assisted extraction (HAE) with water as the solvent. The entire study was approached through the design of experiments (DOE) methodology in order to optimize the number of trials, the quality of the data obtained, and the resources used.

The experimental results (quantification of total phenolic compounds and antioxidant activity) showed that the best conditions for extraction were between 22.2–72.8 minutes of extraction time, 84.8 °C extraction temperature, and an S/L ratio of 0.0141 g/mL. Under these conditions, the different fractions yielded total phenolic compound values (mg GAE/g CSS) of 5.85–6.12 (pure fraction), 4.81–5.22 (aqueous fraction), and 0.87–1.08 (organic fraction); antioxidant activity values by the FRAP method ($\mu\text{mol Trolox/g CSS}$) of 29.24–31.22 (pure fraction), 21.78–25.16 (aqueous fraction), and 4.39–5.59 (organic fraction); and antioxidant activity values by the ABTS method (mg Trolox/g CSS) of 10.27–10.96 (pure fraction), 8.40–9.48 (aqueous fraction), and 2.46–2.76 (organic fraction). These data indicate good fractionation and concentration of the related compounds in each fraction. Furthermore, the statistical analysis of the data revealed that the two variables with a highly significant influence on the process are extraction temperature and the S/L ratio.

Therefore, it can be concluded that the extraction process of a sustainable method has been successfully optimized and can be applied in the food industry.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Grupo de Química Agroalimentaria del Departamento de Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos del CIAL (CSIC-UAM), en especial a mi tutora Yolanda Aguilera Gutiérrez, por permitirme realizar mi Trabajo de Fin de Máster en su laboratorio y por toda la ayuda que me han prestado todos durante estos meses de trabajo.



INFORME DE EVALUACIÓN DE INVESTIGACIÓN RESPONSABLE DE 2. TFM (Trabajo Fin de Máster)

Elche, a 14/04/2025

Nombre del tutor/a	Aurelia Perez Espinosa
Nombre del alumno/a	Martino López de Sancho Marín
Tipo de actividad	Sin implicaciones ético-legales
Título del 2. TFM (Trabajo Fin de Máster)	Extracciones sostenibles de compuestos bioactivos con actividad neuromoduladora a partir de subproductos del café, utilizando herramientas de ciencia de datos e inteligencia artificial
Evaluación de riesgos laborales	No solicitado/No procede
Evaluación ética humanos	No solicitado/No procede
Código provisional	250411024155
Código de autorización COIR	TFM.MGT.APE.MLDSM.250411
Caducidad	2 años

Se considera que el presente proyecto carece de riesgos laborales significativos para las personas que participan en el mismo, ya sean de la UMH o de otras organizaciones.

La necesidad de evaluación ética del trabajo titulado: **Extracciones sostenibles de compuestos bioactivos con actividad neuromoduladora a partir de subproductos del café, utilizando herramientas de ciencia de datos e inteligencia artificial** ha sido realizada en base a la información aportada en el formulario online: "TFG/TFM: Solicitud Código de Investigación Responsable (COIR)", habiéndose determinado que no requiere ninguna evaluación adicional. Es importante destacar que si la información aportada en dicho formulario no es correcta este informe no tiene validez.

Por todo lo anterior, **se autoriza** la realización de la presente actividad.

Atentamente,

Alberto Pastor Campos
Jefe de la Oficina de Investigación Responsable
Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

Información adicional:

- En caso de que la presente actividad se desarrolle total o parcialmente en otras instituciones es responsabilidad del investigador principal solicitar cuantas autorizaciones sean pertinentes, de manera que se garantice, al menos, que los responsables de las mismas están informados.
- Le recordamos que durante la realización de este trabajo debe cumplir con las exigencias en materia de prevención de riesgos laborales. En concreto: las recogidas en el plan de prevención de la UMH y en las planificaciones preventivas de las unidades en las que se integra la investigación. Igualmente, debe promover la realización de reconocimientos médicos periódicos entre su personal; cumplir con los procedimientos sobre coordinación de actividades empresariales en el caso de que trabaje en el centro de trabajo de otra empresa o que personal de otra empresa se desplace a las instalaciones de la UMH; y atender a las obligaciones formativas del personal en materia de prevención de riesgos laborales. Le indicamos que tiene a su disposición al Servicio de Prevención de la UMH para asesorarle en esta materia.

La información descriptiva básica del presente trabajo será incorporada al repositorio público de Trabajos fin de Grado y Trabajos Fin de Máster autorizados por la Oficina de Investigación Responsable de la Universidad Miguel Hernández. También se puede acceder a través de <https://oir.umh.es/solicitud-de-evaluacion/tfg-tfm/>



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Industria del café	1
1.2. Ley 7/2022 de residuos y suelos contaminados para una economía circular	2
1.2.1. <i>Principios generales. Subproducto y fin de la condición de residuo</i>	4
1.2.2. <i>Operaciones de valorización con residuos agroindustriales</i>	4
1.3. Aprovechamiento de los subproductos de la industria del café	5
1.3.1. <i>Métodos de producción y composición química</i>	6
1.3.2. <i>Aplicaciones</i>	7
1.4. Cascarilla de café: compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes	8
1.5. Tecnologías emergentes de extracciones sostenibles	9
1.6. Diseño de experimentos (DOE) en la optimización de procesos	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo general	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. PLAN DE TRABAJO	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1. Preparación de la muestra	14
4.2. Diseño experimental	14
4.3. Análisis estadístico y ajuste del modelo	15
4.4. Obtención de extractos y fracciones enriquecidos en compuestos fenólicos	16
4.4.1. <i>Extracción de compuestos bioactivos mediante HAE</i>	16
4.4.2. <i>Separación de compuestos bioactivos mediante fraccionamiento líquido-líquido</i>	16
4.5. Caracterización química de los extractos y fracciones	17
4.5.1. <i>Compuestos fenólicos totales</i>	17
4.5.2. <i>Actividad antioxidante</i>	17
4.5.2.1. <i>Actividad antioxidante mediante el método FRAP</i>	17
4.5.2.2. <i>Actividad antioxidante mediante el método ABTS</i>	18
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1. Ajuste del modelo	19
5.2. Compuestos fenólicos totales	24
5.2.1. <i>Compuestos fenólicos totales en la fracción pura</i>	24
5.2.2. <i>Compuestos fenólicos totales en la fracción acuosa</i>	26
5.2.3. <i>Compuestos fenólicos totales en la fracción orgánica</i>	26
5.2.4. <i>Comparativa entre las diferentes fracciones</i>	27
5.3. Actividad antioxidante mediante el método FRAP	29
5.3.1. <i>Actividad antioxidante mediante el método FRAP en la fracción pura</i>	29

5.3.2. Actividad antioxidante mediante el método FRAP en la fracción acuosa	29
5.3.3. Actividad antioxidante mediante el método FRAP en la fracción orgánica	30
5.3.4. Comparativa entre las diferentes fracciones.....	30
5.4. Actividad antioxidante mediante el método ABTS	33
5.4.1. Actividad antioxidante mediante el método ABTS en la fracción pura.....	33
5.4.2. Actividad antioxidante mediante el método FRAP en la fracción acuosa	33
5.4.3. Actividad antioxidante mediante el método ABTS en la fracción orgánica.....	34
5.4.4. Comparativa entre las diferentes fracciones.....	35
5.5. Determinación de las condiciones óptimas.....	37
6. CONCLUSIONES	39
7. BIBLIOGRAFÍA.....	40

1. INTRODUCCIÓN

Por su sabor, propiedades refrescantes, estimulantes y beneficiosas para la salud, el café es actualmente una de las bebidas más consumidas en todo el mundo [1,2]. Y, aunque no hay datos exactos sobre su origen, se estima que su uso comenzó en el Siglo IX en Etiopía desde donde se expandió rápidamente durante los siglos posteriores. Hay registros que muestran que la planta del café (cafeto) ya se cultivaba en Yemen en el Siglo XV, extendiéndose posteriormente a Sudán y al resto de la Península Arábiga a través del puerto de Moca.

Para asegurar la exclusividad de este producto, los comerciantes árabes de café, quitaban al fruto las capas exteriores y lo tostaban, haciendo imposible conseguir semillas fértiles que pudieran servir para nuevas plantaciones. No es hasta el Siglo XVII cuando los primeros comerciantes europeos se hacen con semillas fértiles que exportan por América, Asia y Europa, permitiendo que esta planta comenzase a cultivarse en otras regiones del planeta [2].

1.1. Industria del café

El último informe sobre la producción mundial de café, estima que durante el año 2024/25, se han producido y consumido 170 millones de sacos de 60 kg, lo que equivale a 10,8 millones de toneladas, una cifra que supone 0,42 millones de toneladas más respecto al año anterior. En las dos últimas décadas la producción ha mostrado una tendencia positiva, y además, durante los últimos 10 años se ha mantenido por encima de los 150 millones de toneladas anuales [3].

Aproximadamente la mitad de la producción mundial se concentra en una única región, América del Sur, liderada por Brasil con casi el 40%. Para ello, dispone de dos millones de hectáreas dedicadas exclusivamente a su cultivo. La producción en esta región, está muy por encima de Vietnam e Indonesia, que se encuentran en segundo y tercer puesto. Y, aunque ha habido varios intentos de introducir su cultivo en Europa, el único país europeo donde se cultiva actualmente el café es España, en el Valle de Agaete de las Islas Canarias, una pequeña zona de clima tropical. En cuanto a importación, el último informe sobre la importación mundial de café lo lidera Estados Unidos con un valor de 8.900 millones de dólares. Este mismo informe muestra que las importaciones de España en este sector han sido de 1.860 millones de dólares [4].

Un sector agroindustrial con una producción mundial tan elevada genera también una gran cantidad de subproductos. Para aumentar la sostenibilidad de este sector, los subproductos deben ser valorizados con el objetivo de maximizar el beneficio al medioambiente, a la economía y a la sociedad. Con este objetivo la Unión Europea ha planteado una jerarquía de las posibles vías de

gestión de este tipo de subproductos, priorizando de mayor a menor: prevención y reducción, reutilización, reciclaje y finalmente, la incineración y el depósito en vertederos [5] (**Figura 1**).

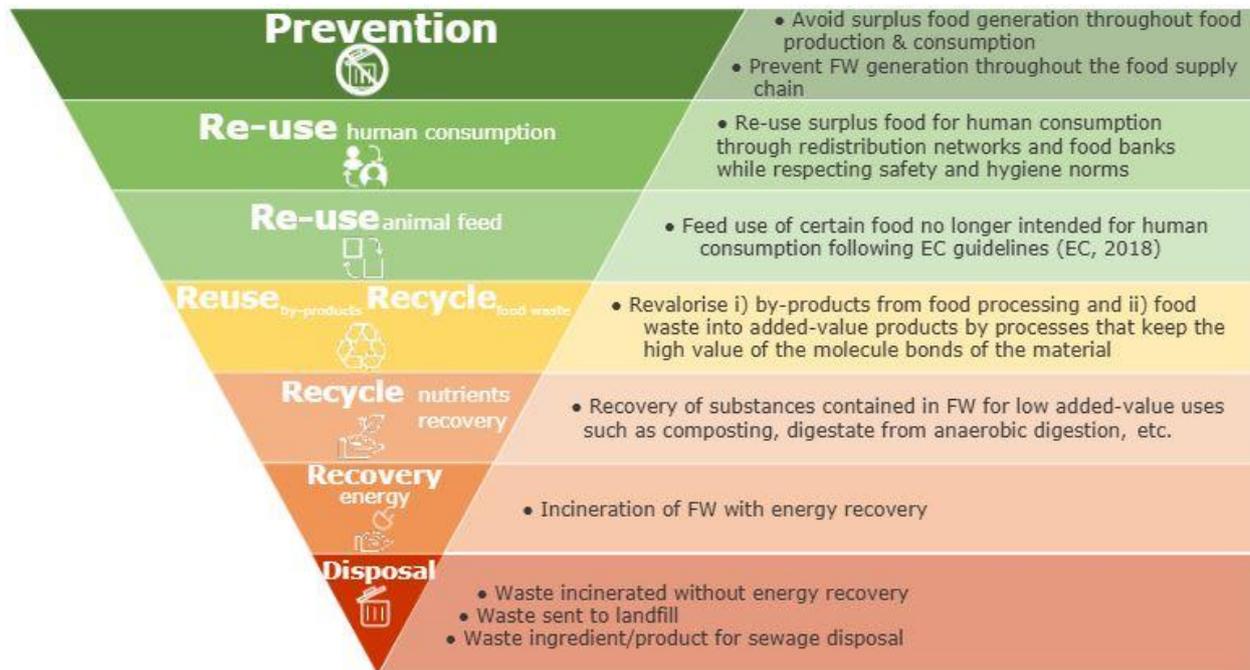


Figura 1. Jerarquía propuesta por la Unión Europea en la gestión de residuos agroindustriales [5].

En los países productores, en ocasiones estos subproductos simplemente se amontonan sin control, lo que supone un gran riesgo para la salud y el medio ambiente. La presencia de ciertos compuestos (cafeína, lignina, taninos, etc.) limita su uso en alimentación animal, por este motivo el principal método de valorización utilizado en estos países es su utilización en compostaje o como fuente de energía, una práctica que no tiene en cuenta su posible valor nutricional o sus propiedades beneficiosas para la salud [6]. Uno de los principales retos de este sector es transformar de manera sostenible la gran cantidad de subproductos que se generan en productos que puedan ser utilizados en la industria alimentaria, utilizando métodos sencillos, económicos y no contaminantes.

1.2. Ley 7/2022 de residuos y suelos contaminados para una economía circular

La normativa europea de la que emana nuestra ley actual de residuos (Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular) es la Directiva (UE) 2018/851, que modifica la Directiva 2008/98/CE (Directiva Marco de Residuos) [7-9].

En esta normativa hay que destacar diversas consideraciones relacionada con este trabajo:

- La gestión de residuos en la Unión Europea debe mejorarse y transformarse en una gestión sostenible de las materias con miras a proteger, preservar y mejorar la calidad del medio ambiente, así como a proteger la salud humana, garantizar la utilización prudente, eficiente y racional de los recursos naturales, promover los principios de la economía circular, mejorar el uso de la energía renovable, aumentar la eficiencia energética, reducir la dependencia de la Unión Europea de los recursos importados, crear nuevas oportunidades económicas y contribuir a la competitividad a largo plazo. A fin de que la economía sea verdaderamente circular, es necesario tomar medidas adicionales sobre producción y consumo sostenibles, centrándose en el ciclo de vida completo de los productos, de un modo que permita preservar los recursos y cerrar el círculo.
- Mejorar la eficiencia del uso de los recursos y asegurarse de que los residuos se valoren como recursos puede contribuir a reducir la dependencia de la Unión Europea de las importaciones de materias primas y facilitar la transición a una gestión más sostenible de las materias y a un modelo de economía circular. Esa transición debe contribuir a los objetivos de crecimiento inteligente, sostenible e integrador y crear oportunidades de importancia para las economías locales y los interesados, a la vez que se potencian las sinergias entre la economía circular y las políticas en materia de energía, clima, agricultura, industria e investigación, y se aportan beneficios al medio.
- Deben incrementarse los objetivos establecidos en la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en materia de preparación para la reutilización y de reciclado de los residuos, a fin de que reflejen mejor la ambición de la Unión Europea de avanzar hacia una economía circular.

La Ley 7/2022, que sustituye a la anterior ley de residuos (Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados) tiene como objetivo actualizar las bases de la gestión de residuos, impulsado así la economía hacia un modelo de economía circular. Para ello, refuerza los principios de jerarquía en la gestión de residuos e introduce nuevos elementos como son el impuesto al vertido o la responsabilidad ampliada del productor, incorporando así objetivos ambiciosos que buscan cumplir con la Agenda 2030 [10].

1.2.1. Principios generales. Subproducto y fin de la condición de residuo

En la Ley 22/2011 ya se establecen los principios generales, entre los cuales cabe destacar los artículos 4 y 5. El artículo 4 define subproducto como “sustancia u objeto, resultante de un proceso de producción, cuya finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto”, de esta manera, se entiende como subproducto alimentario al producto secundario que proviene del procesamiento de alimentos en la industria agroalimentaria. Además. En este artículo se especifica que para la consideración de subproducto se deben cumplir todas las siguientes condiciones de manera simultánea:

- Que se tenga la seguridad de que la sustancia u objeto va a ser utilizado posteriormente.
- Que o se pueda utilizar directamente sin tener que someterse a una transformación ulterior distinta de la práctica industrial habitual.
- Que la sustancia u objeto se produzca como parte integrante de un proceso de producción.
- Que el uso ulterior cumpla todos los requisitos pertinentes relativos a los productos así como a la protección de la salud humana y del medio ambiente, sin que produzca impactos generales adversos para la salud humana o el medio ambiente.

El artículo 5, por otra parte, regula el fin de la condición de residuo y para ello, especifica que los residuos que hayan sido sometidos a una operación de valorización podrán dejar de ser considerados como tal. El objetivo de ambos artículos es optimizar la cadena de valor, aprovechando materiales que aunque no son el objetivo principal de la producción, en el caso de la industria alimentaria son una fuente valiosa y económica para la obtención de otros productos.

1.2.2. Operaciones de valorización con residuos agroindustriales

En el anexo II de la Ley 7/2022, se detallan las diferentes operaciones de valorización y tipos de instalaciones donde se pueden llevar a cabo. Respecto a las operaciones de valorización aplicables a la industria agroalimentaria destaca el apartado R03 sobre “reciclado/recuperación de sustancias orgánicas que no se utilizan como disolventes” donde se encuentran las operaciones R0305, sobre el reciclado de residuos orgánicos en la fabricación de nuevos productos, R0307, sobre el reciclado de residuos orgánicos para la producción de materiales o sustancias, y R0310, sobre la recuperación de sustancias orgánicas contenidas en los residuos.

1.3. Aprovechamiento de los subproductos de la industria del café

La planta del café, es un arbusto originario de la región de Kaffa, al sudeste de Etiopía. Se trata de un arbusto del género *Coffea* que necesita temperaturas suaves y lluvias regulares, haciendo de las zonas tropicales y ecuatoriales las mejores regiones para su cultivo. De todas las especies conocidas del género *Coffea*, son principalmente dos las que se usan para la producción del café, *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. Al café obtenido a partir de estas especies se le denomina café arábica y café robusta, respectivamente, siendo el primero de ellos considerado de mayor calidad por su aroma, acidez y menor contenido en cafeína. La producción de café arábica representa aproximadamente el 75% de la producción mundial [3].

Como se muestra en la **Figura 2**, los frutos de la planta del café son bayas o cerezas carnosas, que una vez están maduras presentan un color rojo intenso o púrpura. Cada una de estas cerezas tiene en su interior dos núcleos separados por un corte central, cada uno de ellos con una semilla de la planta.

El endospermo (semilla o grano de café) se encuentra protegido por una membrana protectora o tegumento, denominada “cascarilla” o “piel plateada” (*coffee silverskin*, CSS). A continuación se encuentra el pericarpio, que se compone de tres secciones, endocarpio, mesocarpio y epicarpio. La más interna es el endocarpio, denominada como “pergamino” (*coffee parchment*, CPM). A continuación se encuentra el mesocarpio, formada por una capa de pectina o mucílago (*coffee mucilage*, CM) y la pulpa (*coffee pulp*, CP). Finalmente, se encuentra el epicarpio, la piel exterior del fruto.



Figura 2. Estructura de la cereza del café [11].

1.3.1. Métodos de producción y composición química

El procesamiento de los frutos de la planta hasta conseguir los granos de café se suele llevar a cabo en los propios países productores de café, y se puede realizar por dos vías diferentes, el método seco o el método húmedo [12]. En el método seco, las cerezas del café se dejan secar bajo el sol o utilizando secadores mecánicos. Durante este proceso, las diferentes capas que forman el pericarpio, se deshidratan y apelmazan, lo que permite su separación conjunta y la obtención directa de los granos verdes de café. A este subproducto se le denomina “cascara” (*coffee husk*, CH) y se trata de una fracción específica de este método de procesamiento. En el método húmedo, el procesamiento se caracteriza por un mayor número de etapas que permiten la separación de diferentes subproductos y por el uso de agua en algunas de estas etapas. Este método comienza con la separación de la pulpa, el resultado se somete a una fermentación que permite la separación del mucílago. Posteriormente los granos se lavan, secan y descascarillan, eliminando el pergamino y obteniendo los granos verdes de café. Aunque los subproductos generados difieren en función del método utilizado, el rendimiento final en ambos es del 21% (21 kg de granos de café por cada 100 kg de cerezas de café procesadas).

Una vez obtenidos los granos verdes de café, estos son transportados hacia su destino, lugar donde se realizan las dos últimas etapas. En primer lugar se realiza el tostado de los granos, generando la cascarilla, y finalmente la molienda, obteniendo así el café molido necesario para la producción de la bebida. Además, si se produce la bebida, también se genera un último subproducto, los posos del café (*spent coffee grounds*, SCG). Cada uno de los subproductos se caracteriza por una composición, en la **Tabla 1** se muestra la cantidad generada de cada subproducto por cada 100 kg de cerezas procesadas, y su composición [12-14].

Tabla 1. Cantidad generada de cada subproducto por cada 100 kg de cerezas procesadas y su composición.

	CH	CP	CM	CPm	CSS	SCG
Cantidad generada (kg)	39-45	39	22	39	2,08-4	65
Humedad (%)	13-15	78-81	84	9	4-7	61
Carbohidratos (%)	45-89	71	45,8-56	45-47	40-44	66-82
Fibra total (%)	18-32	-	0,9	89-91	62,4	60,5
Proteínas (%)	3-13	9-13,5	0,93-17	0,4	16,2-19	5-17,4
Lípidos (%)	0,5-5,5	0,8-4,6	0,12	0,6	2,2-5	10-29
Compuestos fenólicos (%)	0,8-5	0,3-3	-	0,2	1-3	0,01-2,5
Cafeína (%)	0,5-1,5	0,5-2,5	-	0,1-0,13	0,03-1,4	0,02-2

CH: cáscara; CP: pulpa; CM: mucílago; CPm: pergamino; CSS: cascarilla; SCG: posos del café, [12-14].

Como se muestra en la **Tabla 1**, la cáscara es el principal subproducto que se genera en el método seco. Por cada 100 kg de cerezas procesadas se generan 39-45 kg de este subproducto. La cáscara tiene una humedad de 13-15% y está compuesta por carbohidratos (45-89%), proteínas (3-13%), lípidos (0,5-5,5%), compuestos fenólicos (0,8-5%) y cafeína (0,5-1,5%). Los carbohidratos son principalmente celulosa (28%), hemicelulosa (25%) y lignina (38%).

Los principales subproductos que se generan en el método húmedo son la pulpa, el mucílago y el pergamino. Por cada 100 kg de cerezas procesadas, se generan 39 kg de pulpa, un subproducto que tiene una humedad del 78-81% y está compuesto por carbohidratos (71%), proteínas (9-13,5%), lípidos (0,8-4,6%), compuestos fenólicos (0,3-3%) y cafeína (0,5-2,5%). Los carbohidratos son principalmente celulosa (36%), hemicelulosa (9%), azúcares libres (5%) y pectinas (21%). Respecto al mucílago, la cantidad generada es menor, 22 kg por cada 100 kg de cerezas. Este subproducto tiene una humedad del 84% y está compuesto por carbohidratos (45,8-56%), proteínas (0,93-17%) y lípidos (0,12%). Los carbohidratos son principalmente celulosa (8%), hemicelulosa (18%) y pectinas (30%). Tanto la pulpa como el mucílago absorben una gran cantidad del agua utilizada en este método. Finalmente, también se generan 39 kg de pergamino por cada 100 kg de cerezas. Este subproducto apenas absorbe agua, tiene una humedad del 9% y está compuesto por carbohidratos (45-47%), proteínas (0,4%), lípidos (0,6%), compuestos fenólicos (0,2%) y cafeína (0,1-0,13%). Los carbohidratos son principalmente celulosa (12%), hemicelulosa (35%) y lignina (47%).

La cascarilla es el principal subproducto que se genera durante el tostado de los granos verdes de café, antes de su molienda. Se generan 2,08-4 kg por cada 100 kg de cerezas procesadas. Este subproducto tiene una humedad del 4-7% y está compuesto por carbohidratos (40-44%), proteínas (16,2-19%), lípidos (2,2-5%), compuestos fenólicos (1-3%) y cafeína (0,03-1,4%). Los carbohidratos son principalmente celulosa (24%), hemicelulosa (16%) y lignina (29%).

Finalmente, tras utilizar el café molido para obtener la bebida se obtienen los posos del café produciéndose aproximadamente 65 kg por cada 100 kg de cerezas. Este subproducto tiene una humedad del 61% y está compuesto por carbohidratos (66-82%), proteínas (5-17,4%), lípidos (10-29%), compuestos fenólicos (0,01-2,5%) y cafeína (0,02-2).

1.3.2. Aplicaciones

La gran cantidad de subproductos que se generan en este sector, su variedad y composición, así como la necesidad de desarrollar formas sostenibles para su gestión, ha propiciado la búsqueda de diferentes aplicaciones.

Una de las principales aplicaciones es su uso en alimentación, ya que al igual que otros subproductos agroalimentarios vegetales, los subproductos del café son ricos en celulosa, hemicelulosa, lignina, compuestos fenólicos, pectina y otros polisacáridos. En este sentido destaca la obtención de fibra dietética y antocianinas a partir de cáscara, pergamino y cascarilla, o la obtención de pectina y compuestos flavonoides a partir del mucílago [15,16]. Todos estos subproductos también pueden ser utilizados para la obtención de compuestos bioactivos con actividad antioxidante. Estos compuestos pueden ser utilizados en determinadas fórmulas alimentarias para aumentar la capacidad antioxidante y de conservación. Además, su consumo ofrece múltiples beneficios en la prevención de patologías neurodegenerativas como la enfermedad del Parkinson. Esto se debe especialmente debido a la presencia de quercetina, un flavonoide cuya actividad antioxidante ayuda a reducir la peroxidación lipídica, disminuyendo el estrés oxidativo y la apoptosis celular [17,18].

No obstante, los subproductos del café también pueden tener otras aplicaciones no relacionadas directamente con la alimentación. Una de estas aplicaciones es la obtención de productos químicos. Algunos ejemplos son la producción de ácido cítrico y ácido giberélico mediante fermentación en estado sólido utilizando *Gibberella fujikuroi* o *Fusarium moniliforme.*, o la obtención de enzimas y metabolitos secundarios como piranonas, alcaloides o esteroides [19]. Aunque la mayor parte de los bioprocesos orientados a la producción de enzimas o metabolitos se lleva a cabo en medio acuoso, se ha observado que los subproductos del café permiten llevar a cabo estos procesos en estado sólido, disminuyendo los costes. También se ha planteado su uso en alimentación animal, sin embargo, la presencia de ciertos compuestos antinutritivos limita mucho su utilización.

Otra posible aplicación es su utilización en compostaje y vermicompostaje, y en ambos procesos se puede utilizar tanto cáscara como pulpa, sin embargo el uso de pulpa presenta mejores condiciones por su contenido en celulosa y lignina, su capacidad para retener la humedad y por su lenta descomposición [20]. Además, también se ha estudiado la posibilidad de utilizar el pergamino para la producción de carbono activo que permita la eliminación de tintes catiónicos en las aguas residuales [21].

1.4. Cascarilla de café: compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes

De los diferentes subproductos del café, la cascarilla posee una gran variedad de compuestos bioactivos cuyo consumo ofrece importantes beneficios para la salud, donde destaca

especialmente la actividad antioxidante. Este es el motivo por el cual se ha seleccionado este subproducto para la realización de este Trabajo de Fin de Máster.

Los compuestos fenólicos son uno de los compuestos más importantes en la cascarilla, pudiendo diferenciar entre flavonoides y no flavonoides. La gran cantidad de ácido clorogénico presente en la cascarilla, un compuesto fenólico no flavonoide perteneciente a la familia de los ácidos fenólicos, define este subproducto como una fuente muy importante de compuestos bioactivos. Los compuestos fenólicos tienen una gran capacidad antioxidante al ser capaces de reducir o eliminar radicales libres, disminuyendo el riesgo de sufrir enfermedades asociadas al estrés oxidativo [22].

Además de compuestos fenólicos, en la cascarilla se pueden encontrar otros tipos de compuestos como alcaloides, lípidos y melanoïdes. Entre los compuestos alcaloides destacan la cafeína y la trigonelina. La cafeína es una de las principales metilxantinas que se encuentran en el café y la responsable del efecto estimulante. Su interacción con los receptores de adenosina permite disminuir los cuadros de ansiedad e hipertensión, y prevenir y mejorar enfermedades cardiovasculares y renales. La trigonelina es un alcaloide formado a partir de la metilación del ácido nicotínico (vitamina B3), tiene actividad neuroprotectora y anticancerígena y su consumo ayuda a reducir los niveles en sangre de azúcar, lípidos y colesterol, ayudando a prevenir enfermedades cardiovasculares. En cuanto a lípidos, los dos tipos que se encuentran en el café son acilglicéridos y terpenos, donde destacan el cafestol y el kahweol, dos terpenos con actividad antiinflamatoria y anticancerígena. Finalmente, como consecuencia de las altas temperaturas que se alcanzan durante el tostado del café se generan reacciones de Maillard, produciendo una compleja variedad de compuestos melanoïdes, un tipo de compuestos que también presenta actividad antioxidante gracias a su capacidad para quelar metales y eliminar radicales libres [23,24].

1.5. Tecnologías emergentes de extracciones sostenibles

Con el objetivo de realizar un tratamiento sostenible a la gran cantidad de subproductos que se producen en la industria del café, una de las mejores alternativas posibles es abordarlo desde un concepto de biorrefinería. La Agencia Internacional de Energía define este concepto como “el procesamiento sostenible de material de origen biológico para la obtención de productos de valor añadido y/o energía con el objetivo de optimizar la utilización de esta materia, su rentabilidad y minimizar la generación de residuos”. Los productos obtenidos de esta manera pueden ser muy diversos y en función de su naturaleza pueden tener diferentes aplicaciones (productos químicos

para industria cosmética y farmacéutica, extractos para industria alimentaria, etc.). Se trata, por tanto, de un eslabón clave en el objetivo de lograr una economía circular. Al igual que el material biológico utilizado y los productos obtenidos, los métodos de procesamiento pueden ser muy diferentes (fisicoquímicos, químicos, bioquímicos, etc.) [25].

La obtención de productos de valor añadido a partir de subproductos alimentarios se realiza generalmente siguiendo la siguiente secuencia: un pretratamiento donde predominan procesos físicos (secado, triturado, etc.) cuyo objetivo es preparar el material para el procesamiento, a continuación una etapa de extracción química y, finalmente, una nueva etapa de procesos físicos denominado postratamiento cuyo objetivo es la separación y purificación de los compuestos obtenidos. La etapa de extracción química es la más crítica, ya que requiere mayor control, energía y genera una mayor cantidad de residuos, principalmente, disolventes orgánicos. Por este motivo, uno de los principales objetivos actuales es la utilización de métodos de extracción sostenibles donde el consumo de energía es menor, se utilizan disolventes “verdes” y se asegura la calidad del producto final [26].

Uno de los métodos convencionales más utilizados en la extracción de compuestos es mediante el empleo de disolventes orgánicos, donde material es molido y cubierto por el disolvente en el interior de un reactor o cuba, donde permanece durante el periodo de tiempo que sea necesario. Cuando finaliza, el contenido se filtra, separando el disolvente de los restos de material.

Entre los posibles métodos de extracción sostenibles se encuentran los siguientes: empleando alta temperatura (*Heat-Assisted Extraction*, HAE), mediante microondas (*Microwave-Assisted Extraction*, MAE), utilizando ultrasonidos (*Ultrasound-Assisted Extraction*, UAE), mediante fluido supercrítico (*Supercritical fluid extraction*, SFE), mediante homogeneización a alta presión (*High-pressure homogenization*, HPH), utilizando pulsos eléctricos (*Pulsed Electric Fields*, PEF) o utilizando descargas eléctricas de alto voltaje (*High voltage electrical discharges*, HVED) [27-29].

El método utilizado para la realización de este Trabajo de Fin de Máster ha sido la extracción a alta temperatura en medio acuoso, un método sencillo y de bajo coste que facilita la solubilización y difusión de los compuestos bioactivos mediante el control de la temperatura [30].

1.6. Diseño de experimentos (DOE) en la optimización de procesos

Tradicionalmente, la optimización de procesos se ha realizado modificando únicamente uno de los factores independientes o variables (*One factor at a time*, OFAT). Esta metodología es sencilla y presenta dos grandes inconvenientes, en primer lugar, como los factores dependientes o

resultados dependen del punto de partida es difícil determinar las condiciones óptimas y, en segundo lugar, no se puede separar la variación obtenida entre experimentos de la mejora real a menos que los experimentos se repliquen un número elevado de veces [31].

El diseño de experimentos (*Design of experiments*, DOE) permite modificar varios factores independientes de forma simultánea, detectando como las interacciones entre factores independientes pueden afectar al proceso. Se trata de una metodología muy bien estructurada cuyo objetivo es garantizar un análisis sólido. El procedimiento, de una manera resumida, comienza con la determinación de los factores independientes (las variables que se controlan) y los dependientes (los resultados de aquello que se mide). A continuación se seleccionan los niveles de las variables y se selecciona el diseño experimental que mejor se adecue al objetivo de la experimentación. Posteriormente se realiza la experimentación y la recopilación de los datos, y si estos siguen una distribución normal se selecciona un método de análisis estadístico que formula una hipótesis, de manera que si se acepta la hipótesis nula, se concluye que no hay diferencia significativa y el proceso finaliza. El paso final consiste en la formulación de conclusiones basadas en los resultados obtenidos [32].

Por ejemplo, para estudiar mediante OFAT la influencia de tres variables, cada uno de ellas con dos niveles posibles, sería necesario realizar ocho experimentos. Sin embargo, si este estudio se aborda desde una metodología DOE, realizando únicamente cuatro de los experimentos se puede obtener mucha más información. Por este motivo, se ha seleccionado esta metodología para la realización del Trabajo de Fin de Máster.

2. OBJETIVOS

Con una producción anual de 10,8 millones de toneladas, la industria del café es la responsable de generar una enorme cantidad de subproductos agroalimentarios cuyo tratamiento debe abordarse desde una perspectiva sostenible que suponga una mejora económica para el sector y para el medio ambiente, apostando así por la economía circular.

2.1. Objetivo general

Diseñar y optimizar un proceso eficiente y sostenible de extracción y fraccionamiento de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de cascarilla de café, empleando extracción asistida por calor (HAE) con agua como disolvente.

2.2. Objetivos específicos

Para ello se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Diseñar y desarrollar la experimentación mediante la metodología de Diseño de Experimentos basada en extracciones sólido-líquidas asistidas por calor (HAE) a partir de la cascarilla de café.
- Aplicar un sistema de fraccionamiento líquido-líquido con el fin de separar los extractos en fracciones de distinta polaridad.
- Cuantificar el contenido en compuestos fenólicos totales en cada una de las fracciones y evaluar la capacidad antioxidante de las fracciones (FRAP y ABTS).
- Determinar las condiciones más eficaces de extracción para maximizar el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.
- Optimizar las variables/parámetros para maximizar la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

3. PLAN DE TRABAJO

Los objetivos se realizaron siguiendo bajo el plan de trabajo (**Figura 2**), donde se muestran las etapas que hay que realizar en el procesado de la muestra para posteriormente realizar un proceso de extracción, separando las distintas fracciones y compuestos de interés.

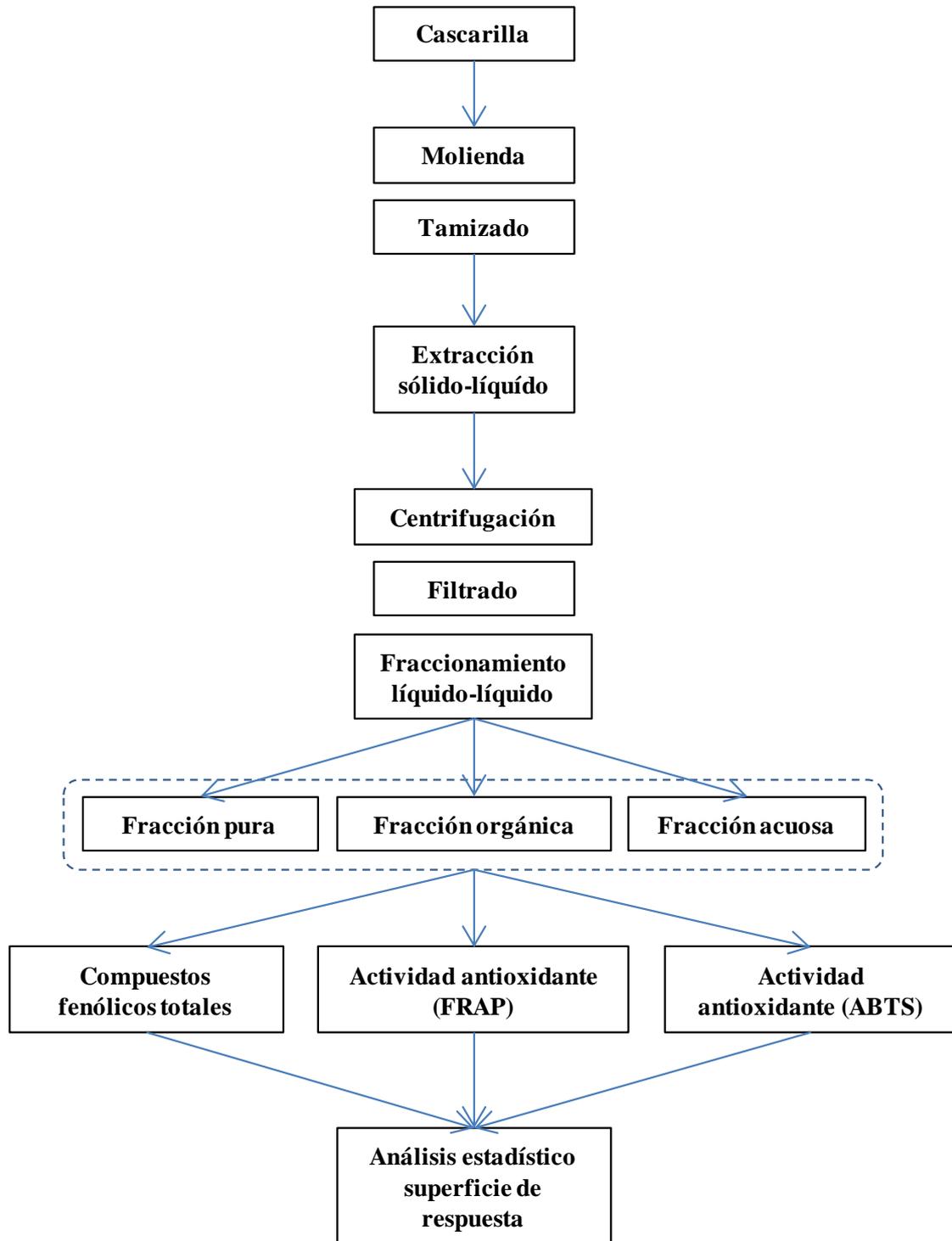


Figura 2. Plan de trabajo realizado durante el Trabajo de Fin de Máster

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Preparación de la muestra

La cascarilla proviene de la empresa La Mexicana, donde realizan un tueste medio-claro de los granos verdes de café que importan. La molienda de la cascarilla se realizó en un molinillo eléctrico de aspas (Nessler, A10 Yellowline) y posteriormente se tamizó con un tamiz de 4 mallas: 1 mm, 0,5 mm, 200 μm y $<200 \mu\text{m}$ (Cisa Sieving Technologies), obteniendo una distribución de tamaños de 0,21%, 0,75%, 12,41% y 86,6%, respectivamente. La cascarilla molida fue guardada en bolsas a vacío y conservada a 4 °C hasta su uso.

4.2. Diseño experimental

Con el objetivo de optimizar las variables implicadas en la extracción, se implementó un diseño experimental compuesto central circunscrito (CCC). El diseño fue generado mediante el software MODDE 13.0 (Sartorius Stedim Data Analytics AB) considerando tres variables del proceso de extracción: tiempo (min) (X_1), temperatura (°C) (X_2) y relación sólido:líquido (S/L) (g/mL) (X_3), cada una con cinco niveles codificados (-1,68; -1; 0; 1; 1,68). La selección de los valores empleados para la optimización de las variables (tiempo, temperatura y relación sólido:líquido) se basó en estudios científicos previos [33-36]. En la **Figura 3** se muestra la representación gráfica del diseño generado. Para abarcar los cinco niveles se escogieron 14 experimentos (N1-N14) a los que se añadieron tres réplicas centrales para evaluar la reproducibilidad (N15-17). Además, para aumentar la robustez, todos estos experimentos se hicieron por duplicado (N18-N34) y se realizaron en orden aleatorio. En la **Tabla 2** se muestran las condiciones experimentales para la extracción de compuestos bioactivos de la cascarilla de café.

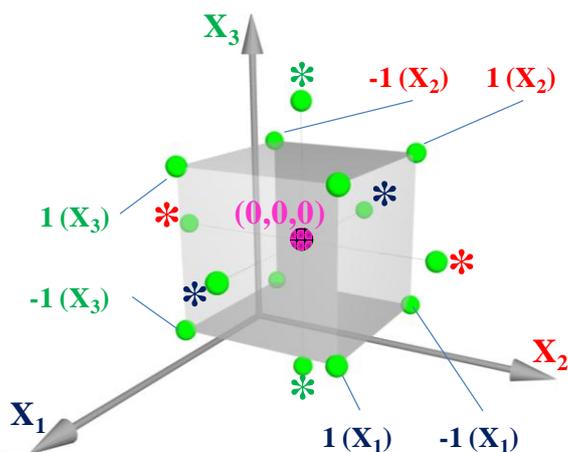


Figura 3. Representación gráfica del diseño experimental seleccionado (CCC). Los asteriscos (*) representan los niveles codificados (-1,68 y 1,68) de las variables. X_1 = tiempo (min); X_2 = temperatura (°C); X_3 = relación S/L (g/mL).

Tabla 2. Diseño experimental seleccionado para optimizar la extracción de compuestos.

Código del experimento	Orden de experimentación	Variables		
		X ₁	X ₂	X ₃
N1	7	22,2 [-1]	40,2 [-1]	0,0141 [-1]
N2	3	72,8 [1]	40,2 [-1]	0,0141 [-1]
N3	4	22,2 [-1]	84,8 [1]	0,0141 [-1]
N4	18	72,8 [1]	84,8 [1]	0,0141 [-1]
N5	6	22,2 [-1]	40,2 [-1]	0,0409 [1]
N6	27	72,8 [1]	40,2 [-1]	0,0409 [1]
N7	9	22,2 [-1]	84,8 [1]	0,0409 [1]
N8	17	72,8 [1]	84,8 [1]	0,0409 [1]
N9	8	5 [-1,68]	62,5 [0]	0,0275 [0]
N10	26	90 [1,68]	62,5 [0]	0,0275 [0]
N11	20	47,5 [0]	25 [-1,68]	0,0275 [0]
N12	32	47,5 [0]	100 [1,68]	0,0275 [0]
N13	11	47,5 [0]	62,5 [0]	0,005 [-1,68]
N14	23	47,5 [0]	62,5 [0]	0,05 [1,68]
N15-17 ^a	22,29,25	47,5 [0]	62,5 [0]	0,0275 [0]
N18	30	22,2 [-1]	40,2 [-1]	0,0141 [-1]
N19	14	72,8 [1]	40,2 [-1]	0,0141 [-1]
N20	19	22,2 [-1]	84,8 [1]	0,0141 [-1]
N21	2	72,8 [1]	84,8 [1]	0,0141 [-1]
N22	10	22,2 [-1]	40,2 [-1]	0,0409 [1]
N23	12	72,8 [1]	40,2 [-1]	0,0409 [1]
N24	1	22,2 [-1]	84,8 [1]	0,0409 [1]
N25	16	72,8 [1]	84,8 [1]	0,0409 [1]
N26	33	5 [-1,68]	62,5 [0]	0,0275 [0]
N27	31	90 [1,68]	62,5 [0]	0,0275 [0]
N28	5	47,5 [0]	25 [-1,68]	0,0275 [0]
N29	21	47,5 [0]	100 [1,68]	0,0275 [0]
N30	13	47,5 [0]	62,5 [0]	0,005 [-1,68]
N31	24	47,5 [0]	62,5 [0]	0,05 [1,68]
N32-34 ^a	28,15,34	47,5 [0]	62,5 [0]	0,0275 [0]

X₁ = tiempo (min); X₂ = temperatura (°C); X₃ = relación S/L (g/mL).

El valor entre corchetes muestra el nivel codificado de cada variable

^a experimentos correspondientes a las réplicas centrales

4.3. Análisis estadístico y ajuste del modelo

Los resultados experimentales se analizaron estadísticamente y se ajustaron mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), que permite ajustar modelos cuadráticos donde las relaciones entre las variables pueden ser lineales o no lineales mediante un número reducido de experimentos. Mediante este análisis se determinaron los coeficientes de regresión lineales, cuadráticos y de interacción. El valor de estos coeficientes determinó la influencia de cada una de las variables en el modelo, de manera que aquellos con un mayor valor indicaban un mayor impacto. La idoneidad del ajuste del modelo se evaluó mediante el análisis de la varianza (ANOVA), utilizando diferentes parámetros estadísticos como el coeficiente de determinación (R^2 y R^2 ajustado), el coeficiente de predicción (Q^2), la validez y la reproducibilidad del modelo, la desviación estándar relativa (RSD), los valores p y F , y la falta de ajuste (*Lack of fit*, LOF) de ambos.

El impacto de cada una de las variables en el modelo se evaluó ajustando los coeficientes a un modelo polinomial cuadrático según la siguiente **ecuación (1)**:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

donde Y es la respuesta calculada por el modelo, β_0 el coeficiente constante (ordenada en el origen), β_i los coeficientes de regresión lineales, β_{ii} los coeficientes de regresión cuadráticos, β_{ij} los coeficientes de regresión de interacción, X_i y X_j las variables.

4.4. Obtención de extractos y fracciones enriquecidos en compuestos fenólicos

Todos los experimentos se realizaron por duplicado con el objetivo de obtener una fracción pura (FP) y una muestra a partir de la cual obtener mediante fraccionamiento una fracción acuosa (FA) y una fracción orgánica (FO). Para ello se utilizaron tubos Falcon de 50 mL a los que se añadió 20 mL de agua Milli-Q a la temperatura necesaria y los gramos de cascarilla de café para conseguir la relación S/L (X_3).

4.4.1. Extracción de compuestos bioactivos mediante HAE

Para realizar la extracción sólido-líquido, los tubos Falcon se dejaron en agitación en un rotor (Heidolph Reax 2) que se ubicó en el interior de una estufa (Memmert, BE 600) a la temperatura (X_2) y durante el tiempo correspondiente (X_1). Finalizada la extracción, los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a 4000 rpm (J.P. Selecta, Meditronic) con el objetivo de favorecer la precipitación de la cascarilla, obteniendo un pellet y un sobrenadante bien definidos.

A continuación, se separó el sobrenadante del pellet con ayuda de una micropipeta. El pellet se desechó y el sobrenadante se filtró para eliminar las partículas de muy pequeño tamaño. El filtrado se realizó a vacío con matraz de Kitasato y embudo Büchner, utilizando filtros de celulosa con un grosor 180 μm y un tamaño de partícula de 11 μm (Whatman).

El sobrenadante de uno de los duplicados se congeló a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, se liofilizó y se resuspendió en agua Milli-Q, obteniendo así la FP. El sobrenadante obtenido del otro duplicado se enrasó a 20 mL con agua Milli-Q para compensar la posible pérdida de agua producida por la absorción del pellet. Este volumen se utilizó para realizar el fraccionamiento líquido-líquido.

4.4.2. Separación de compuestos bioactivos mediante fraccionamiento líquido-líquido

A los 20 mL se les añadió 20 mL de acetato de etilo, consiguiendo una relación 1:1. Los tubos Falcon se dejaron en agitación en un rotor (Heidolph, Reax 2) durante 20 minutos a temperatura

ambiente. Finalizada la extracción líquido-líquido se separaron ambas fases con ayuda de una micropipeta. La fase acuosa se congeló a -20 °C, se liofilizó y se resuspendió en agua Milli-Q, obteniendo la FA. El disolvente de la fase orgánica se evaporó en rotavapor (Buchi Rotavapor, R-124) a una velocidad de 200 rpm y una temperatura del baño a 80 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de etanol, obteniendo así la FO. Esta fracción se conservó a -80 °C hasta su uso.

4.5. Caracterización química de los extractos y fracciones

En cada una de las fracciones se cuantificaron los compuestos fenólicos totales (CFT) y la actividad antioxidante (AA) mediante los métodos FRAP y ABTS. Todas las muestras se analizaron por triplicado y cada uno de los análisis se repitió en días diferentes. Para poder realizar el ensayo con todas las muestras, se utilizaron placas de 384 pocillos.

4.5.1. Compuestos fenólicos totales

Los CFT se determinaron mediante el método de Folin-Ciocalteu [37]. Este método se basa en la reducción del reactivo de Folin por los compuestos fenólicos presentes en la muestra, dando lugar a la formación de un complejo azul. Este complejo permite cuantificar la concentración de los compuestos fenólicos mediante espectrofotometría. En cada uno de los pocillos se añadieron 3 µL de muestra, 90 µL de reactivo de Folin diluido (1:14 v/v) y, tras una incubación de 3 minutos, 15 µL de Na₂CO₃ al 20%. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. La absorbancia se midió a 750 nm en lector de placas (VANTASTAR, BMG LabTech). Como patrón se utilizó ácido gálico (GAE) (10–300 mg/L), y los resultados se expresaron como mg eq-GAE/L de muestra, que finalmente se transformaron en mg eq-GAE/g cascarilla.

4.5.2. Actividad antioxidante

La AA se determinó por dos métodos diferentes, el método FRAP y el método ABTS.

4.5.2.1. Actividad antioxidante mediante el método FRAP

Este método se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de la muestra para reducir Fe³⁺ a Fe²⁺ en condiciones ácidas, generando un complejo azul con TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) [38]. El reactivo FRAP se preparó mezclando tampón acetato (0,3M, pH=3,6), TPTZ en HCl (10 mmol/L) y FeCl₃·6H₂O (20 mmol/L) en proporción 10:1:1. En cada uno de los pocillos se añadieron 3 µL de muestra y 100 µL de reactivo FRAP. Las placas se incubaron durante 10 minutos a 37 °C y en oscuridad. La absorbancia se midió a 593 nm en lector de placas (VANTASTAR, BMG LabTech, Alemania). Se utilizó Trolox como estándar (100–800 µmol/L).

Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol eq-Trolox/L}$ de muestra, que finalmente se transformaron en $\mu\text{mol eq-Trolox/g}$ de cascarilla.

4.5.2.2. Actividad antioxidante mediante el método ABTS

Este método se basa en la capacidad de los compuestos antioxidantes de la muestra para reducir el radical ABTS^+ (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), lo que provoca una disminución en la absorbancia de manera proporcional a la concentración de compuestos antioxidantes [39]. El radical se generó mezclando ABTS con persulfato potásico y dejando la solución en agitación durante 24 h en oscuridad. Esta solución se diluyó en PBS (5 mM, pH 7,4) hasta alcanzar una absorbancia de 0,7–0,8 UA a 734 nm. A cada uno de los pocillos se añadieron 10 μL de muestra y 90 μL de ABTS^+ . La absorbancia se midió a 734 nm (VANTASTAR, BMG LabTech, Alemania). Se empleó Trolox como estándar (0,01–0,1 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg eq-Trolox/mL de muestra, que finalmente se transformaron en mg eq-Trolox/g de cascarilla.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Ajuste del modelo

Una vez cuantificados los CFT y la AA, se llevó a cabo el análisis estadístico y el ajuste del modelo. En la **Tabla 3** se muestran los resultados estadísticos y los coeficientes de regresión obtenidos.

El coeficiente de determinación, R^2 , es un parámetro que indica qué porcentaje de la varianza de una variable es explicada por el modelo de regresión, dando una idea de lo bien que se ajusta un modelo a los resultados experimentales obtenidos. Su valor se encuentra entre 0 (ausencia de modelo) y 1 (modelo perfecto). En general, valores de R^2 superiores a 0,5 evidencian un buen modelo [40]. En el cálculo de este parámetro, también se puede tener en cuenta el número de factores y el tamaño de la muestra, obteniendo un coeficiente de determinación ajustado que evita la sobreestimación del ajuste del modelo. Los resultados obtenidos mostraron un R^2 entre 0,817 y 0,935, lo que indica un buen ajuste del modelo.

Debido al hecho de que utilizar un único parámetro estadístico para evaluar un modelo es insuficiente, también se tuvo en cuenta el coeficiente de predicción, Q^2 , un parámetro que permite evaluar la capacidad predictiva de un modelo mediante validación cruzada. Se trata de un parámetro con un límite superior de 1 y sin límite inferior, pudiendo tener valores negativos. Se consideran buenos los valores de Q^2 superiores a 0,5 y muy buenos cuando estos son superiores a 0,9 [41]. Los resultados obtenidos muestran valores de Q^2 superiores a 0,765, lo que indica una buena capacidad predictiva del modelo.

La desviación estándar relativa (*relative standard deviation*, RSD), o coeficiente de variación, es un parámetro que expresa la desviación estándar como un porcentaje de la media. Los resultados obtenidos muestran valores entre 0,017 y 1,276, lo que confirma el buen ajuste del modelo.

En cuanto a la validez del modelo, valores inferiores a 0,25 suelen indicar algún tipo de problema, como puede ser la presencia de valores muy alejados del modelo, un modelo inapropiado o problemas relacionados con la distribución normal de los datos [41]. Los resultados obtenidos muestran valores entre 0,764 y 0,978 que indican una buena validez del modelo. No obstante se observan dos excepciones, correspondientes a la AA mediante el método ABTS de FP y FA con valores de 0,357 y 0,394, respectivamente. Estos valores pueden deberse a la presencia de algún valor muy alejado del modelo.

Tabla 3. Resultados estadísticos y coeficientes de regresión obtenidos en el ajuste del modelo.

Modelo	CFT			AA-FRAP			AA-ABTS		
	FP	FA	FO	FP	FA	FO	FP	FA	FO
R ²	0,909	0,881	0,898	0,905	0,817	0,854	0,935	0,934	0,918
R ² ajustado	0,896	0,858	0,884	0,882	0,789	0,833	0,919	0,917	0,912
Q ²	0,882	0,809	0,862	0,858	0,765	0,791	0,879	0,888	0,900
RSD	0,220	0,200	0,033	1,006	1,276	0,344	0,019	0,017	0,026
Validez	0,914	0,764	0,978	0,880	0,825	0,942	0,357	0,394	0,829
Reproducibilidad	0,833	0,864	0,855	0,873	0,787	0,805	0,943	0,937	0,911
Valor F (regresión)	69,64	37,19	64,07	39,61	29,05	40,94	57,61	54,45	161,86
Valor p (regresión)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Valor F (LOF)	0,703	1,142	0,422	0,785	0,976	0,597	2,275	2,241	0,975
Valor p (LOF)	0,709	0,390	0,917	0,621	0,498	0,795	0,076	0,089	0,505
Coefficientes (β)									
Constantes	5,009***	4,191***	0,701***	23,675***	20,204***	3,512***	8,898***	7,991***	1,949***
Lineales									
X ₁	0,176**	0,133	0,005	0,216	0,353	0,025	0,088	0,086	0,001
X ₂	0,500***	0,421***	0,116***	2,346***	1,752***	0,609***	0,654***	0,562***	0,226***
X ₃	-0,478***	-0,353***	-0,119***	-2,554***	-1,912***	-0,554***	-1,413***	-1,164***	-0,444***
Cuadráticos									
X ₁ ²	-0,175*	-0,128	-0,010	-0,266	-0,325	-0,075	-0,255*	-0,292*	-0,040
X ₂ ²	-0,008	-0,009	-0,002	0,043	-0,279	-0,108	-0,146	-0,264*	-0,039
X ₃ ²	0,101	0,114	0,031*	0,232	0,211	0,104	0,266*	-0,221	0,099*
Interacción									
X ₁ ·X ₂	-0,026	-0,056	-0,012	-0,399	-0,732*	0,154	-0,111	-0,236	0,029
X ₁ ·X ₃	-0,025	-0,003	0,002	-0,334	0,001	-0,044	-0,179	-0,008	-0,044
X ₂ ·X ₃	-0,041	-0,011	-0,046**	-0,831**	0,191	-0,202*	0,159	-0,073	-0,074

CFT: Compuestos fenólicos totales; AA: actividad antioxidante

FP: fracción pura; FA: fracción acuosa; FO: fracción orgánica

R² y R² ajustado: Coeficientes de determinación; Q²: Coeficiente de predicción; RSD: Desviación estándar relativa

F: F-test; p: probabilidad; LOF: falta de ajuste. Nivel de significancia: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

β: Coeficientes de regresión; X₁ = tiempo (min); X₂ = temperatura (° C); X₃ = relación sólido/líquido (g/mL).

Los valores de reproducibilidad del modelo obtenidos, entre 0,787 y 0,943, indican que el error de las réplicas realizadas no fue significativo y que el valor obtenido en las mismas condiciones fue muy parecido [42]. En la **Figura 4**, se muestran los valores obtenidos de R², Q², validez y reproducibilidad del modelo.

El valor F es un parámetro que permite evaluar la significancia de un modelo de regresión e indica que al menos una de las variables incluidas en el modelo es estadísticamente significativa sobre los resultados obtenidos, es decir, ayuda a determinar si el modelo de regresión es mejor que simplemente utilizar la media de los resultados obtenidos como método de predicción [43]. El valor F, debe ser comparado con el valor F crítico, calculado en 3,42, un parámetro que se calcula en base al número de variables y niveles, número de resultados y tipo de diseño experimental. Por otra parte, el valor p, representa la probabilidad de que la respuesta del modelo tenga valores iguales o más extremos que los obtenidos experimentalmente, asumiendo que la

hipótesis nula es verdadera (es decir, que no hay relación entre las variables). Si el valor p es menor que el nivel de significancia estadística (fijado en $p < 0,05$), se rechaza la hipótesis nula y se concluye que el modelo es significativo. Por tanto, lo ideal es obtener un valor F superior al valor F crítico (3,42) y un valor p inferior al nivel de significancia estadística (0,05). Los resultados muestran, en todos los casos, valores F superiores al valor F crítico y valores p inferiores al nivel de significancia estadística, lo que sugiere que los valores obtenidos experimentalmente no se desvían significativamente del modelo previsto. Para facilitar la terminología referente al nivel de significancia, a lo largo del trabajo se utilizan los términos: no significativo ($p > 0,05$), significativo ($p < 0,05$), muy significativo ($p < 0,01$) y altamente significativo ($p < 0,001$).

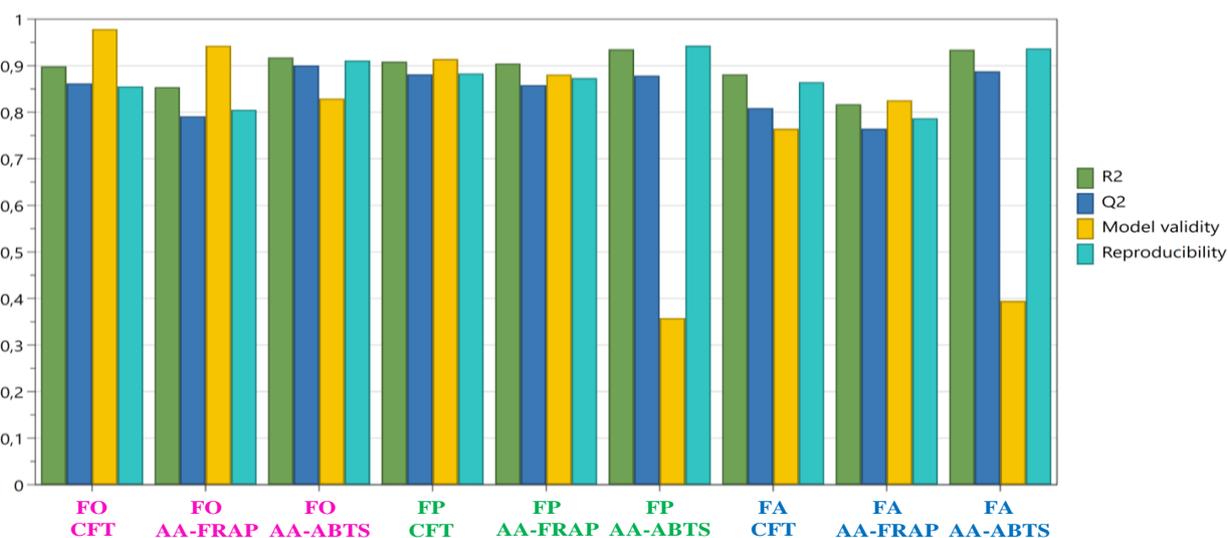


Figura 4. Representación de los valores obtenidos de R^2 , Q^2 , validez y reproducibilidad (FP: fracción pura; FA: fracción acuosa; FO: fracción orgánica; CFT: compuestos fenólicos totales; AA: actividad antioxidante).

En cuanto al LOF, un valor F inferior al valor crítico y un valor p superior al nivel de significancia estadística indican que no hay evidencia significativa de falta de ajuste y, por lo tanto, el modelo es capaz de explicar los resultados obtenidos.

En la **Figura 5** se muestra la relación entre los valores obtenidos experimentalmente y la respuesta que predice el modelo, de manera que la agrupación de los puntos alrededor de la línea diagonal indica un buen ajuste. Las figuras muestran que, en CFT (A, D y G) y AA mediante el método FRAP (B, E y H), la fracción donde se obtiene un mejor ajuste del modelo es FP (figuras A y B, respectivamente). En la **Tabla 3** se puede ver como en ambos casos esta fracción tiene los mayores valores de R^2 y Q^2 . Respecto a AA mediante el método ABTS (C, F e I) las figuras no permiten visualmente determinar cual tiene un mayor ajuste, debido precisamente al valor tan similar que tienen ambos parámetros en las tres fracciones.

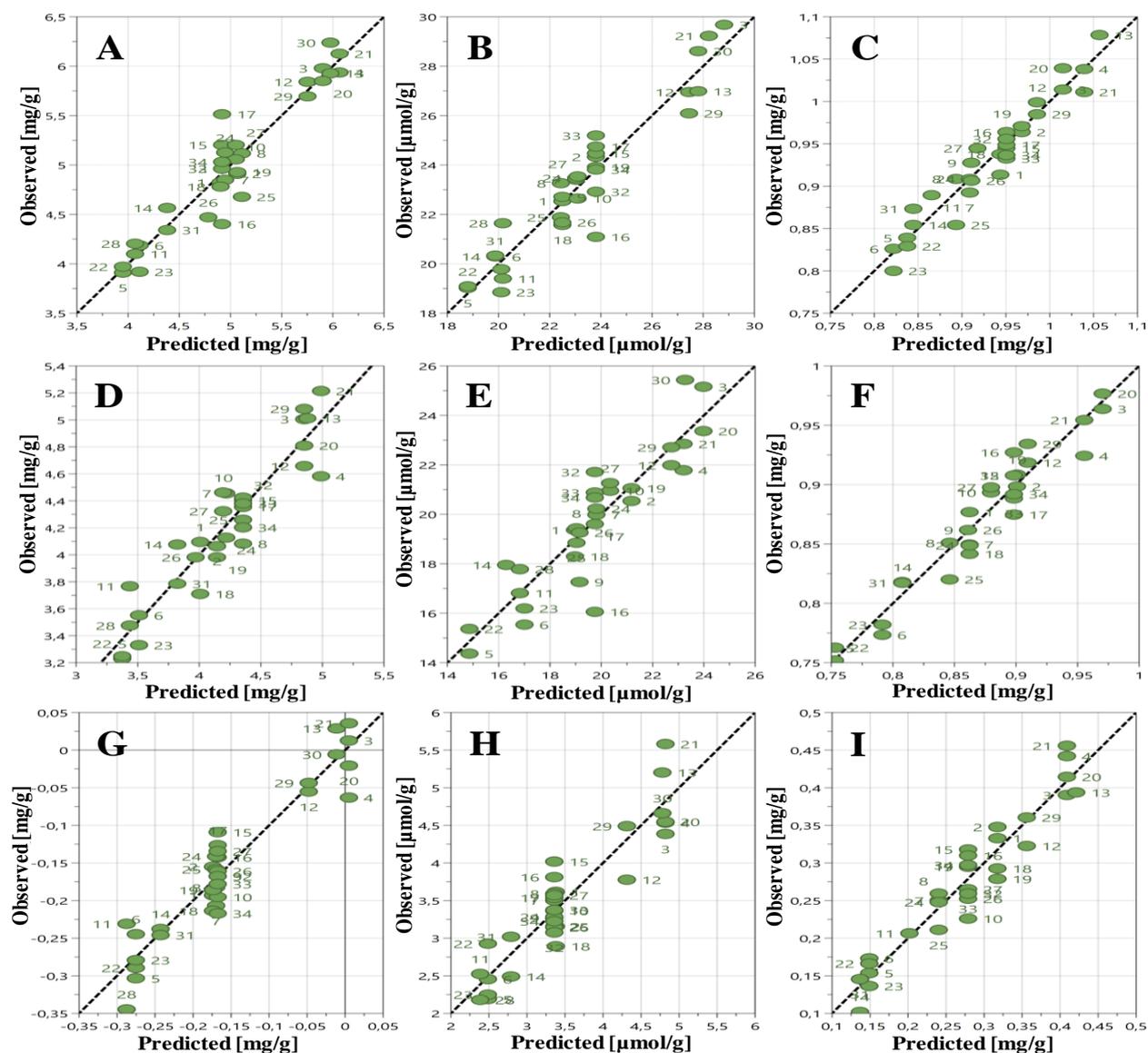


Figura 5. Representación de los valores obtenidos experimentalmente frente a la respuesta que predice el modelo. (A: CFT en FP; B: AA-FRAP en FP; C: AA-ABTS en FP; D: CFT en FA; E: AA-FRAP en FA; F: AA-ABTS en FA; G: CFT en FO; H: AA-FRAP en FO; I: AA-ABTS en FO).

En la tabla de **Tabla 3** también se muestran los coeficientes de regresión lineales, cuadráticos y de interacción obtenidos. Los coeficientes no significativos son variables que no influyen sobre el modelo y por lo tanto no aparecen en el sistema de ecuaciones. La representación gráfica de las ecuaciones obtenidas con estos coeficientes permite obtener una superficie de respuesta tridimensional. En la **Figura 6** se muestra, como ejemplo, la representación tridimensional de las variables tiempo de extracción (X_1) y temperatura de extracción (X_2) frente a la respuesta predicha por el modelo. En las representaciones tridimensionales de esta figura, la escala de colores (de azul a rojo) refleja el aumento en la intensidad de la respuesta de manera que el color

de la superficie indica los valores de las variables donde se predice que la respuesta es mayor. También es muy importante la superficie obtenida, ya que una superficie plana indica que la respuesta varía de manera lineal con las variables representadas mientras que una superficie curva indica la existencia de efectos cuadráticos o de interacción, pudiendo llegar a mostrar valores mínimos, máximos, etc. La proyección de la figura tridimensional sobre uno de los planos axiales genera lo que se conoce como mapa de contornos (*Contour plot*). Los resultados obtenidos (**Tabla 3**) muestran que las figuras con mayor curvatura, C y F, presentan efectos cuadráticos significativos en alguna de las variables representadas. Respecto a las figuras que tienen una menor curvatura, esto se debe a la existencia de coeficientes que aunque no son significativos son distintos a cero, introduciendo ruido en la representación. Un ejemplo claro son las figuras D y E, cuyos coeficientes cuadráticos de la variable tiempo de extracción (X_1) no son significativos y tienen valores $-0,128$ y $-0,325$, respectivamente.

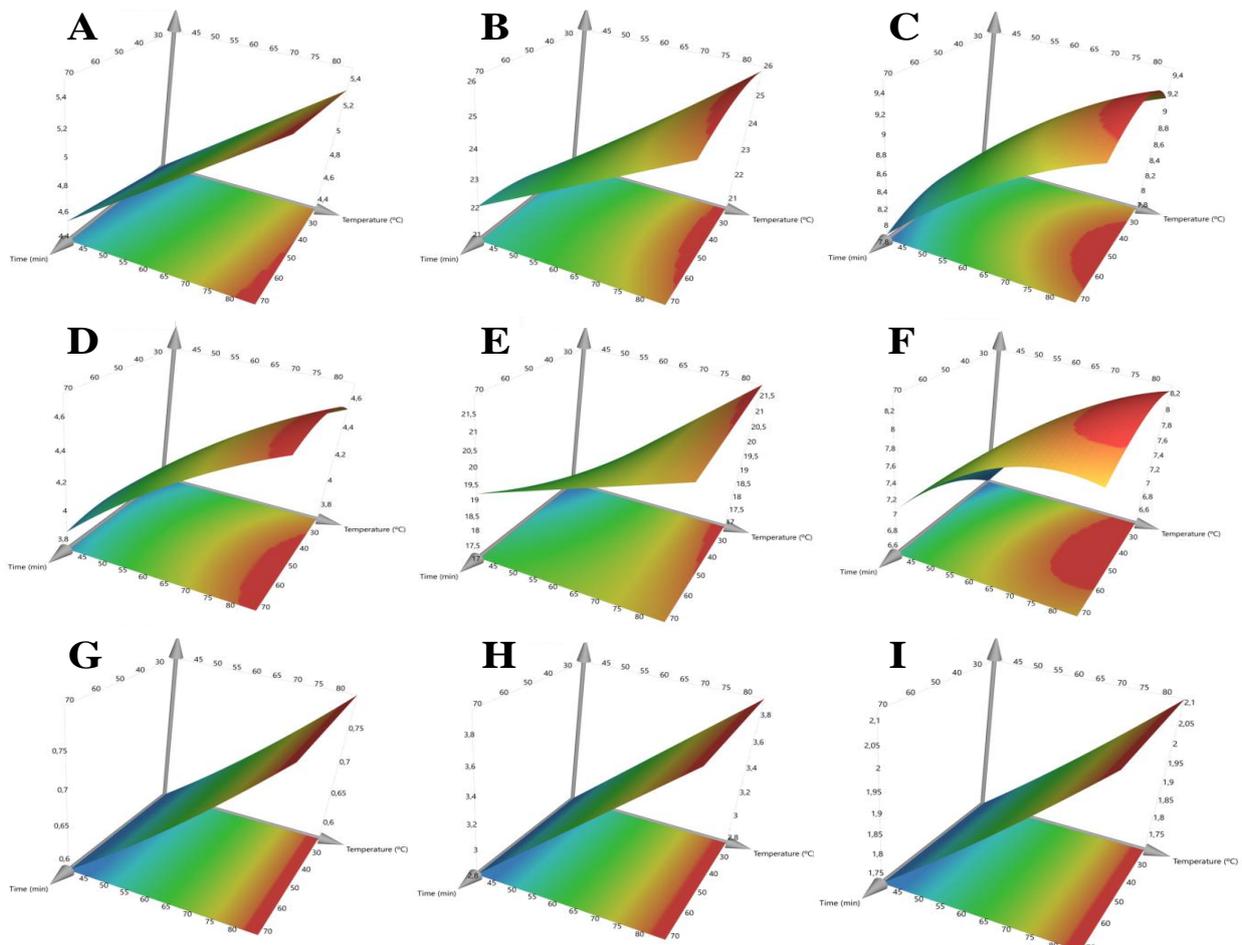


Figura 6. Superficie de respuesta tridimensional. El eje X corresponde a la variable X_2 (temperatura), el eje Z a X_1 (tiempo) y el eje Y a la respuesta del modelo (A: CFT en FP; B: AA-FRAP en FP; C: AA-ABTS en FP; D: CFT en FA; E: AA-FRAP en FA; F: AA-ABTS en FA; G: CFT en FO; H: AA-FRAP en FO; I: AA-ABTS en FO).

5.2. Compuestos fenólicos totales

En la **Tabla 4** se muestran los resultados obtenidos en el análisis de CFT y AA de todos los experimentos y cada una de sus fracciones.

5.2.1. Compuestos fenólicos totales en la fracción pura

Los valores de CFT obtenidos en la FP oscilan entre 3,22 y 6,24 mg GAE/g cascarilla, correspondientes a los experimentos N9 y N30, respectivamente. No obstante, hay que tener en cuenta que los resultados de los duplicados de estos experimentos, N26 y N13, presentan cierta diferencia, posiblemente como consecuencia del error experimental, esto es especialmente notable en el caso del valor mínimo de CFT (N9 y N26). Teniendo en cuenta estas diferencias, se observa que los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus réplicas N20 y N21. Al comparar los resultados obtenidos entre los pares de experimentos comprendidos entre N1-N10 (N1 con N2, N3 con N4, etc.), que se diferencian en el tiempo de extracción (X_1), se observa que el valor de CFT aumenta con el valor del tiempo. Por otra parte, al comparar experimentos donde varía la temperatura de extracción (X_2), como es N2 con N4 y N6 con N8, se observa que el valor de CFT aumenta con el valor de la temperatura. Finalmente, al comparar experimentos donde varía la relación S/L (X_3), como es N1 con N5 y N2 con N6, se observa que el valor de CFT disminuye con el valor de la relación S/L. Estos mismos resultados se observan en las réplicas. Según estos resultados, las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3).

En la **Tabla 3**, se observa que el valor de CFT aumenta linealmente, de forma muy significativa con el aumento del tiempo de extracción (X_1), obteniéndose un coeficiente con un valor de 0,176; y altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 0,500 y -0,478, respectivamente. En términos cuadráticos, el valor de CFT disminuye de manera significativa con el tiempo de extracción (X_1), obteniéndose un coeficiente con un valor de -0,175. Finalmente, en términos de interacción no se observa significancia en ninguna de las variables. Los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3) influyen de manera altamente significativa sobre la extracción, ambas de manera lineal.

Tabla 4. Diseño experimental y resultados experimentales.

Código	Orden	Variables			CFT (mg GAE/g SSC)			AA-FRAP (μ mol TROLOX/g SSC)			AA-ABTS (mg TROLOX/g SSC)		
		X ₁	X ₂	X ₃	FP	FA	FO	FP	FA	FO	FP	FA	FO
N1	7	22,2 [-1]	40,2 [-1]	0,0141 [-1]	4,83 \pm 0,41	4,10 \pm 0,13	0,64 \pm 0,05	22,54 \pm 2,19	19,36 \pm 1,09	3,61 \pm 0,27	8,20 \pm 0,49	7,54 \pm 0,19	2,15 \pm 0,34
N2	3	72,8 [1]	40,2 [-1]	0,0141 [-1]	4,91 \pm 0,12	4,06 \pm 0,11	0,70 \pm 0,02	24,34 \pm 1,93	20,52 \pm 2,03	3,16 \pm 0,32	9,20 \pm 0,19	7,92 \pm 0,44	2,23 \pm 0,29
N3	4	22,2 [-1]	84,8 [1]	0,0141 [-1]	5,98 \pm 0,26	5,00 \pm 0,36	1,03 \pm 0,02	29,69 \pm 2,64	25,16 \pm 1,04	4,39 \pm 0,27	10,33 \pm 0,49	9,20 \pm 0,29	2,46 \pm 0,27
N4	18	72,8 [1]	84,8 [1]	0,0141 [-1]	5,93 \pm 0,29	4,58 \pm 0,23	0,87 \pm 0,07	31,22 \pm 2,82	21,78 \pm 1,05	4,54 \pm 0,39	10,92 \pm 0,27	8,40 \pm 0,30	2,76 \pm 0,31
N5	6	22,2 [-1]	40,2 [-1]	0,0409 [1]	3,91 \pm 0,20	3,23 \pm 0,14	0,50 \pm 0,02	19,04 \pm 1,99	14,35 \pm 1,27	2,19 \pm 0,19	6,90 \pm 0,39	5,65 \pm 0,19	1,42 \pm 0,09
N6	27	72,8 [1]	40,2 [-1]	0,0409 [1]	4,19 \pm 0,11	3,55 \pm 0,21	0,57 \pm 0,02	19,78 \pm 1,20	15,53 \pm 1,13	2,45 \pm 0,07	6,70 \pm 0,05	5,93 \pm 0,07	1,49 \pm 0,14
N7	9	22,2 [-1]	84,8 [1]	0,0409 [1]	4,85 \pm 0,19	4,46 \pm 0,17	0,62 \pm 0,07	23,39 \pm 2,71	19,99 \pm 1,67	3,50 \pm 0,30	7,80 \pm 0,10	7,07 \pm 0,17	1,78 \pm 0,17
N8	17	72,8 [1]	84,8 [1]	0,0409 [1]	5,12 \pm 0,39	4,08 \pm 0,14	0,66 \pm 0,06	23,26 \pm 2,58	19,43 \pm 1,12	3,59 \pm 0,34	8,10 \pm 0,14	7,10 \pm 0,12	1,82 \pm 0,14
N9	8	5 [-1,68]	62,5 [0]	0,0275 [0]	3,22 \pm 0,19	2,87 \pm 0,23	0,68 \pm 0,03	22,73 \pm 2,05	17,28 \pm 1,57	3,27 \pm 0,29	8,46 \pm 0,22	7,28 \pm 0,18	1,97 \pm 0,25
N10	26	90 [1,68]	62,5 [0]	0,0275 [0]	5,06 \pm 0,26	4,46 \pm 0,11	0,64 \pm 0,05	22,64 \pm 3,11	20,96 \pm 1,62	3,36 \pm 0,31	8,97 \pm 0,22	7,83 \pm 0,14	1,68 \pm 0,30
N11	20	47,5 [0]	25 [-1,68]	0,0275 [0]	4,10 \pm 0,26	3,77 \pm 0,36	0,59 \pm 0,02	19,39 \pm 1,73	16,82 \pm 1,46	2,53 \pm 0,15	7,76 \pm 0,10	6,73 \pm 0,07	1,61 \pm 0,17
N12	32	47,5 [0]	100 [1,68]	0,0275 [0]	5,84 \pm 0,20	4,66 \pm 0,13	0,88 \pm 0,03	26,96 \pm 2,80	21,97 \pm 1,42	3,77 \pm 0,27	9,98 \pm 0,17	8,29 \pm 0,10	2,10 \pm 0,10
N13	11	47,5 [0]	62,5 [0]	0,005 [-1,68]	5,93 \pm 0,21	5,01 \pm 0,23	1,07 \pm 0,08	26,98 \pm 3,84	22,88 \pm 1,83	5,21 \pm 0,29	11,99 \pm 1,20	11,08 \pm 0,79	2,48 \pm 0,14
N14	23	47,5 [0]	62,5 [0]	0,05 [1,68]	4,57 \pm 0,24	4,08 \pm 0,41	0,58 \pm 0,04	20,29 \pm 1,96	17,96 \pm 1,43	2,49 \pm 0,12	7,14 \pm 0,32	6,58 \pm 0,33	1,27 \pm 0,10
N15	22	47,5 [0]	62,5 [0]	0,0275 [0]	5,20 \pm 0,22	4,41 \pm 0,27	0,78 \pm 0,02	24,46 \pm 2,42	22,00 \pm 1,93	4,02 \pm 0,48	8,81 \pm 0,49	8,09 \pm 0,21	2,08 \pm 0,23
N16	29	47,5 [0]	62,5 [0]	0,0275 [0]	4,40 \pm 0,13	3,32 \pm 0,24	0,72 \pm 0,04	21,11 \pm 2,11	16,05 \pm 0,67	3,81 \pm 0,35	9,20 \pm 0,35	8,46 \pm 0,18	2,04 \pm 0,22
N17	25	47,5 [0]	62,5 [0]	0,0275 [0]	5,52 \pm 0,60	4,36 \pm 0,17	0,75 \pm 0,05	24,74 \pm 2,32	19,62 \pm 1,80	3,53 \pm 0,31	8,88 \pm 0,26	7,49 \pm 0,24	1,97 \pm 0,21
N18	30	22,2 [-1]	40,2 [-1]	0,0141 [-1]	4,78 \pm 0,25	3,71 \pm 0,18	0,61 \pm 0,03	21,56 \pm 2,92	18,29 \pm 1,15	2,90 \pm 0,16	8,67 \pm 0,44	6,94 \pm 0,67	1,96 \pm 0,37
N19	14	72,8 [1]	40,2 [-1]	0,0141 [-1]	4,93 \pm 0,15	3,98 \pm 0,21	0,65 \pm 0,06	23,92 \pm 2,08	21,04 \pm 0,71	2,44 \pm 0,15	9,36 \pm 0,26	8,10 \pm 0,65	1,90 \pm 0,20
N20	19	22,2 [-1]	84,8 [1]	0,0141 [-1]	5,85 \pm 0,26	4,81 \pm 0,24	0,95 \pm 0,04	30,80 \pm 2,97	23,35 \pm 1,53	4,55 \pm 0,40	10,96 \pm 0,28	9,48 \pm 0,20	2,60 \pm 0,30
N21	2	72,8 [1]	84,8 [1]	0,0141 [-1]	6,12 \pm 0,24	5,22 \pm 0,23	1,08 \pm 0,09	29,24 \pm 2,46	22,86 \pm 2,18	5,59 \pm 0,49	10,27 \pm 0,70	9,01 \pm 0,26	2,86 \pm 0,31
N22	10	22,2 [-1]	40,2 [-1]	0,0409 [1]	3,97 \pm 0,22	3,25 \pm 0,14	0,51 \pm 0,04	19,08 \pm 3,19	15,38 \pm 1,48	2,92 \pm 0,24	6,74 \pm 0,17	5,79 \pm 0,41	1,47 \pm 0,14
N23	12	72,8 [1]	40,2 [-1]	0,0409 [1]	3,92 \pm 0,23	3,33 \pm 0,18	0,53 \pm 0,01	18,84 \pm 2,24	16,21 \pm 1,27	2,25 \pm 0,18	6,30 \pm 0,30	6,05 \pm 0,10	1,37 \pm 0,13
N24	1	22,2 [-1]	84,8 [1]	0,0409 [1]	5,13 \pm 0,37	4,13 \pm 0,14	0,72 \pm 0,03	23,48 \pm 2,22	20,22 \pm 1,43	3,28 \pm 0,17	8,09 \pm 0,18	7,06 \pm 0,13	1,77 \pm 0,12
N25	16	72,8 [1]	84,8 [1]	0,0409 [1]	4,68 \pm 0,14	4,26 \pm 0,25	0,70 \pm 0,07	21,88 \pm 1,93	18,84 \pm 1,25	3,16 \pm 0,12	7,15 \pm 0,20	6,61 \pm 0,17	1,63 \pm 0,08
N26	33	5 [-1,68]	62,5 [0]	0,0275 [0]	4,47 \pm 0,12	3,98 \pm 0,20	0,69 \pm 0,01	21,67 \pm 2,38	19,27 \pm 0,87	3,14 \pm 0,22	8,06 \pm 0,26	7,27 \pm 0,21	1,79 \pm 0,22
N27	31	90 [1,68]	62,5 [0]	0,0275 [0]	5,20 \pm 0,18	4,33 \pm 0,15	0,73 \pm 0,06	23,56 \pm 2,66	21,27 \pm 1,16	3,57 \pm 0,32	8,81 \pm 0,27	7,91 \pm 0,24	1,84 \pm 0,18
N28	5	47,5 [0]	25 [-1,68]	0,0275 [0]	4,20 \pm 0,11	3,48 \pm 0,11	0,45 \pm 0,04	21,64 \pm 3,12	17,79 \pm 0,74	2,18 \pm 0,19	8,12 \pm 0,20	6,98 \pm 0,19	1,30 \pm 0,17
N29	21	47,5 [0]	100 [1,68]	0,0275 [0]	5,70 \pm 0,18	5,08 \pm 0,35	0,90 \pm 0,06	26,11 \pm 3,03	22,71 \pm 1,87	4,49 \pm 0,44	9,67 \pm 0,16	8,60 \pm 0,05	2,29 \pm 0,22
N30	13	47,5 [0]	62,5 [0]	0,005 [-1,68]	6,24 \pm 0,27	5,51 \pm 0,43	0,99 \pm 0,07	28,62 \pm 3,47	25,43 \pm 1,70	4,66 \pm 0,44	13,60 \pm 0,62	11,85 \pm 0,93	3,73 \pm 0,66
N31	24	47,5 [0]	62,5 [0]	0,05 [1,68]	4,34 \pm 0,21	3,78 \pm 0,09	0,57 \pm 0,01	20,34 \pm 2,18	18,57 \pm 0,99	3,02 \pm 0,35	7,47 \pm 0,06	6,57 \pm 0,10	1,40 \pm 0,12
N32	28	47,5 [0]	62,5 [0]	0,0275 [0]	4,97 \pm 0,16	4,42 \pm 0,16	0,68 \pm 0,04	22,92 \pm 2,34	21,71 \pm 0,90	3,08 \pm 0,27	9,03 \pm 0,17	8,09 \pm 0,13	1,81 \pm 0,21
N33	15	47,5 [0]	62,5 [0]	0,0275 [0]	4,96 \pm 0,27	4,38 \pm 0,19	0,66 \pm 0,07	25,21 \pm 2,57	20,87 \pm 0,95	3,38 \pm 0,15	8,56 \pm 0,25	7,73 \pm 0,17	1,82 \pm 0,18
N34	34	47,5 [0]	62,5 [0]	0,0275 [0]	5,03 \pm 0,24	4,20 \pm 0,14	0,61 \pm 0,05	23,81 \pm 2,59	20,68 \pm 1,62	3,23 \pm 0,12	8,64 \pm 0,15	7,80 \pm 0,17	1,98 \pm 0,21

X₁ = tiempo (min); X₂ = temperatura (°C); X₃ = relación sólido/líquido (g/mL).

CFT: Compuestos fenólicos totales; AA: actividad antioxidante

FP: fracción pura; FA: fracción acuosa; FO: fracción orgánica

5.2.2. *Compuestos fenólicos totales en la fracción acuosa*

Los valores de CFT obtenidos en la FA oscilan entre 2,87 y 5,51 mg GAE/g cascarilla, que al igual que en la FP corresponden a los experimentos N9 y N30, respectivamente. Teniendo en cuenta la diferencia que presentan los resultados de sus réplicas, se observa que los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus replicas N20 y N21. Al realizar la misma comparación que en el apartado anterior (por variables), el valor de CFT varía de igual manera a lo que ocurre en FP, aumentando con el valor del tiempo de extracción (X_1) y la temperatura de extracción (X_2) y disminuyendo con el valor de la relación S/L (X_3). De nuevo, las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3).

Al analizar la **Tabla 3**, se observa que el valor de CFT aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 0,421 y -0,353, respectivamente. En términos cuadráticos o de interacción no se observa significancia en ninguna de las variables. Al igual que ocurre en FP, los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3), influyen de forma altamente significativa sobre la extracción, ambas de manera lineal.

5.2.3. *Compuestos fenólicos totales en la fracción orgánica*

Los valores de CFT obtenidos en la FO oscilan entre 0,45 y 1,08 mg GAE/g cascarilla, que corresponden a los experimentos N28 y N21, respectivamente. Teniendo en cuenta la diferencia de los resultados que presenta N28 con su réplica N11, se observa que los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus replicas N20 y N21. Al realizar la comparación por variables, se observa que el valor de CFT aumenta con el valor de la temperatura de extracción (X_2) y disminuye con el valor de la relación S/L (X_3). Las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3).

En la **Tabla 3**, se observa que el valor de CFT aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 0,116 y -0,119, respectivamente. En términos cuadráticos, el valor de CFT aumenta de forma significativa con la relación S/L (X_3), obteniéndose un coeficiente con un valor de 0,031. Finalmente, en términos de interacción el valor de CFT disminuye muy significativamente con la interacción de la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3),

obteniéndose un coeficiente con un valor de -0,046. Al igual que ocurre en FP y FA, los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la extracción se ve influenciada de manera altamente significativa por dos variables, temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3), ambas de manera lineal.

5.2.4. Comparativa entre las diferentes fracciones

Los coeficientes de regresión significativos se aplicaron a la **Ecuación 1**, obteniendo las ecuaciones del modelo correspondientes a la determinación de CFT:

$$Y_{(FP)} = 5,009 + 0,176 X_1 + 0,500 X_2 - 0,478 X_3 - 0,175 X_1^2$$

$$Y_{(FA)} = 4,191 + 0,421 X_2 - 0,353 X_3$$

$$Y_{(FO)} = 0,701 + 0,116 X_2 - 0,119 X_3 + 0,031 X_3^2 - 0,046 X_2 X_3$$

Al analizar estas ecuaciones, junto con los datos de la **Tabla 3**, se observa que el coeficiente de regresión constante (β_0) es altamente significativo en todas las fracciones. Este primer término de las ecuaciones representa el valor medio de la respuesta cuando todas las variables se encuentran en el nivel de codificación cero, es decir, el punto central del diseño experimental. La variación de este término, no afecta a la forma de la superficie (curvatura, pendiente, etc.), sino a su posición respecto al eje de la respuesta, es decir, desplaza la superficie hacia abajo o hacia arriba y con ello el valor de la respuesta global. Respecto al resto de coeficientes, en todas las fracciones se observa que el valor de CFT aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y disminución de la relación S/L (X_3). No obstante, la FP es la única fracción en la que se observa que el tiempo de extracción (X_1) tiene una influencia muy significativa sobre la respuesta. En el caso de los coeficientes cuadráticos, se observan coeficientes significativos en las fracciones FP y FO, correspondientes al tiempo de extracción (X_1) y la relación S/L (X_3), respectivamente. Finalmente, en cuanto a coeficientes de interacción, la única fracción en la que se encuentra un coeficiente muy significativo es la FO, correspondiente a la interacción entre temperatura de extracción (X_2) y relación S/L (X_3).

En la **Figura 7** se muestra la variación de la respuesta, según el modelo, de cada una de las fracciones. Cada una de las figuras (A: FP, B: FA y C: FO) se compone de las tres proyecciones posibles (mapas de contornos) de la figura tridimensional del modelo. En estas figuras se observa que las dos variables con una mayor influencia sobre la respuesta son la temperatura de extracción (X_2) (cambio de azul hacia rojo en sentido ascendente) y la relación S/L (X_3) (cambio de rojo hacia azul entre las proyecciones de una misma fracción). La influencia del tiempo de

extracción (X_1) es mucho menor. Como ejemplo, en la figura A (FP), la respuesta máxima se puede alcanzar con tiempos de extracción (X_1) entre 20-75 minutos, a una temperatura de extracción (X_2) entre 75-80 °C y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3). A estos mismos valores la respuesta disminuye con el aumento de la relación S/L y además, es menor en las figuras B y C (FA y FO, respectivamente).

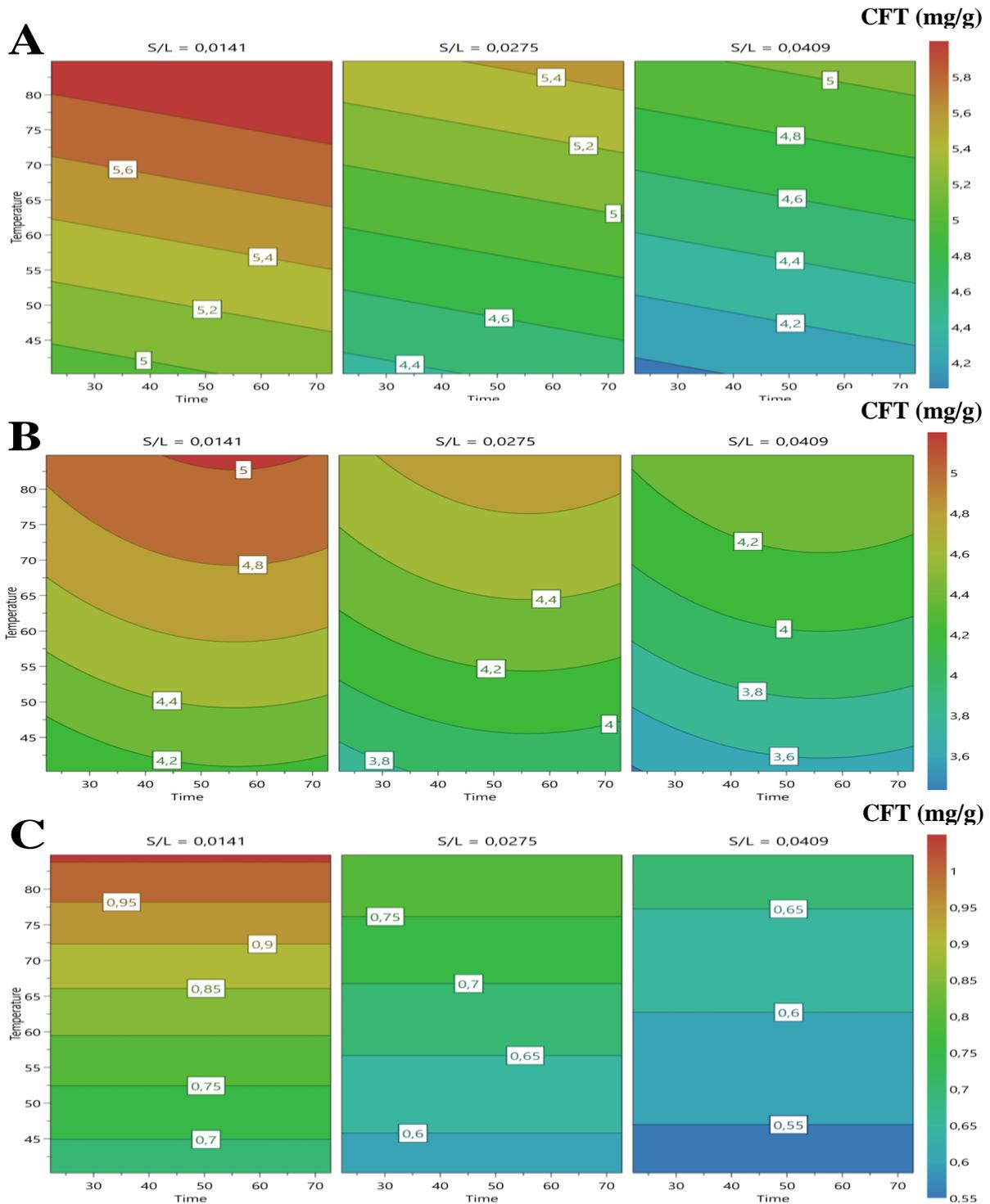


Figura 7. Variación de la respuesta del modelo (CFT) en función de las diferentes variables. (A: FP; B: FA; C: FO).

Finalmente, al comparar los resultados experimentales de las tres fracciones (**Tabla 4**), se observa que la respuesta de FP, en general, equivale a la suma de las respuestas obtenidas en FA y FO, lo que indica un buen proceso de fraccionamiento. Los valores obtenidos en estas fracciones muestran, en términos de porcentaje, que tras el fraccionamiento aproximadamente el 85% de los CFT se encuentran en FA y el 15% restante en FO.

5.3. Actividad antioxidante mediante el método FRAP

5.3.1. Actividad antioxidante mediante el método FRAP en la fracción pura

Los valores de AA obtenidos en la FP (**Tabla 4**) se encuentran entre 18,84 y 31,22 $\mu\text{mol TROLOX/g}$ cascarilla, correspondientes a los experimentos N23 y N4, respectivamente. Los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus réplicas N20 y N21. Se observa que el valor de la AA aumenta con el valor del tiempo de extracción (X_1) y la temperatura de extracción (X_2) y disminuye con el valor de la relación S/L (X_3). Según estos resultados, las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3).

En la **Tabla 3**, se observa que el valor de AA aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 2,356 y -2,554, respectivamente. En términos cuadráticos no se observa significancia en ninguna de las variables, sin embargo, en términos de interacción, el valor de la AA disminuye de forma muy significativa con la interacción de la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3), obteniéndose un coeficiente con un valor de -0,831. Los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3) tienen una influencia altamente significativa sobre la extracción, ambas de manera lineal.

5.3.2. Actividad antioxidante mediante el método FRAP en la fracción acuosa

Los valores de AA obtenidos en la FA oscilan entre 14,35 y 25,43 $\mu\text{mol TROLOX/g}$ cascarilla, correspondientes a los experimentos N5 y N30, respectivamente. Teniendo en cuenta la diferencia que presentan los resultados de sus réplicas, los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus réplicas N20 y N21. Se observa que el valor de la AA varía de igual manera a lo que ocurre en la FP, aumentando con el valor del tiempo de extracción (X_1) y la temperatura de extracción (X_2) y disminuyendo con el valor de la relación S/L (X_3). Las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3).

Al analizar la **Tabla 3**, se observa que el valor de AA aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 1,752 y -1,912, respectivamente. En términos cuadráticos no se observa significancia en ninguna de las variables, sin embargo, en términos de interacción, el valor de la AA disminuye significativamente con la interacción del tiempo de extracción (X_1) y la temperatura de extracción (X_2), obteniéndose un coeficiente con un valor de -0,732. Los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3) influyen de forma altamente significativa sobre la extracción, ambas de manera lineal.

5.3.3. Actividad antioxidante mediante el método FRAP en la fracción orgánica

Los valores de AA obtenidos en la FO se encuentran entre 2,18 y 5,59 $\mu\text{mol TROLOX/g}$ cascari-lla, que corresponden a los experimentos N28 y N21, respectivamente. Teniendo en cuenta la diferencia que presentan los resultados de sus réplicas, los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus replicas N20 y N21. Se observa que el valor de la AA aumenta con el valor de la temperatura de extracción (X_2) y disminuye con el valor de la relación S/L (X_3). Según estos resultados, las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3).

Al analizar la **Tabla 3**, se observa que el valor de AA aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 0,609 y -0,554, respectivamente. En términos cuadráticos no se observa significancia en ninguna de las variables, sin embargo, en términos de interacción, el valor de la AA disminuye significativamente con la interacción de la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3), obteniéndose un coeficiente con un valor de -0,202. Los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3) influyen de manera altamente significativa sobre la extracción, ambas de manera lineal.

5.3.4. Comparativa entre las diferentes fracciones

Los coeficientes de regresión significativos se aplicaron a la **Ecuación 1**, obteniendo las ecuaciones del modelo correspondientes a la determinación de AA mediante el método FRAP:

$$Y_{(FP)} = 23,675 + 2,346 X_2 - 2,554 X_3 - 0,831 X_2 X_3$$

$$Y_{(FA)} = 20,204 + 1,752 X_2 - 1,912 X_3 - 0,732 X_1 X_2$$

$$Y_{(FO)} = 3,512 + 0,609 X_2 - 0,554 X_3 - 0,202 X_2 X_3$$

Al analizar estas ecuaciones, junto con los datos de la **Tabla 3**, se observa que el coeficiente de regresión constante (β_0) es altamente significativo en todas las fracciones. Respecto al resto de coeficientes, en todas las fracciones se observa que el valor de AA aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y disminución de la relación S/L (X_3). En términos cuadráticos no se observa significancia en ninguna de las variables. Finalmente, en todas las fracciones se observan coeficientes de interacción; la interacción de la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3) de forma muy significativa en FP, la interacción del tiempo de extracción (X_1) y la temperatura de extracción (X_2) de manera significativa en FA y, la interacción de la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3) de forma significativa en FO.

En la **Figura 8** se muestra la variación de la respuesta de cada una de las fracciones. En las figuras A, B y C se observa que las dos variables que tienen una mayor influencia sobre la respuesta son la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3). La influencia del tiempo de extracción (X_1) es mucho menor. Como ejemplo, en la figura A (FP), la respuesta máxima se puede alcanzar con tiempos de extracción (X_1) entre 20-75 minutos, a una temperatura de extracción (X_2) entre 77-79 °C y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3). A estos mismos valores la respuesta disminuye con el aumento de la relación S/L (X_3) pero, a diferencia de lo que ocurre en la **Figura 7** (variación de la respuesta de CFT), la respuesta se mantiene alta en las figuras B y C (FP y FO, respectivamente). Además, también se observa una mayor curvatura de las líneas de contorno en las figuras A y B (FP y FA, respectivamente) como consecuencia del mayor valor que tienen los coeficientes de regresión cuadráticos y de interacción. Por ejemplo, si se comparan los coeficientes cuadráticos y de interacción (**Tabla 3**) de FA en CFT (figura 7B) y FA en AA mediante el método FRAP (figura 8B), se observa que estos últimos, a excepción del coeficiente de interacción entre el tiempo de extracción (X_1) y la relación S/L (X_3), tienen un mayor valor.

Al comparar los resultados experimentales de las tres fracciones (**Tabla 4**), al igual que ocurre en CFT, se observa que la respuesta de FP, en general, equivale a la suma de las respuestas obtenidas en FA y FO. Los valores obtenidos en estas fracciones muestran, en términos de porcentaje, que tras el fraccionamiento aproximadamente el 85% de los compuestos con AA se encuentran en la FA y el 15% restante en la FO.

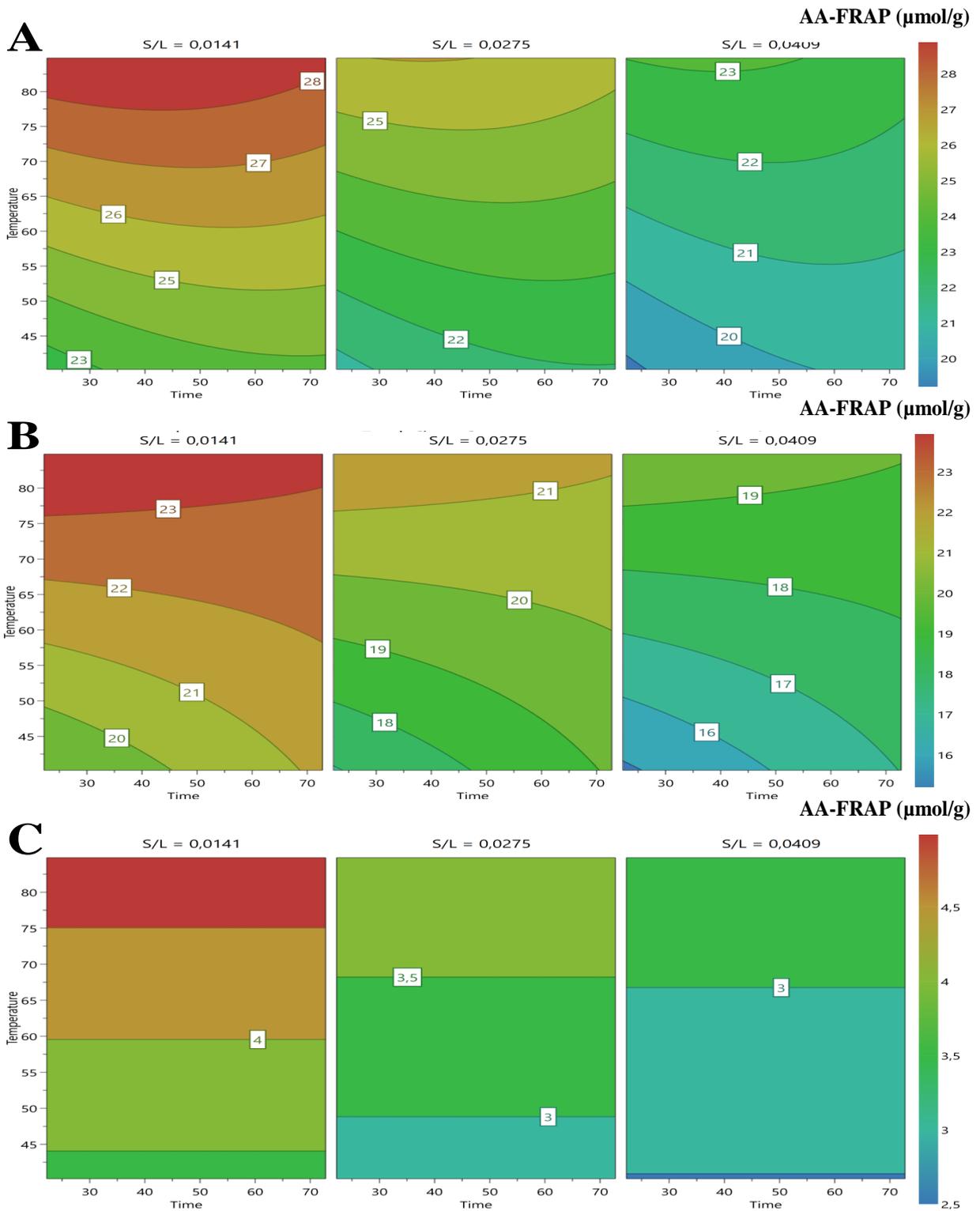


Figura 8. Variación de la respuesta del modelo (AA mediante el método FRAP) en función de las diferentes variables. (A: FP; B: FA; C: FO).

5.4. Actividad antioxidante mediante el método ABTS

5.4.1. Actividad antioxidante mediante el método ABTS en la fracción pura

Los valores de AA obtenidos en la FP (**Tabla 4**) oscilan entre 6,30 y 13,60 mg TROLOX/g cascari-lla, correspondientes a los experimentos N23 y N30, respectivamente. Los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus réplicas N20 y N21. No obstante, a diferencia de lo que ocurre en los apartados anteriores, en los valores más elevados también hay que tener en cuenta N30, y su réplica N13, ya que entre ellas no hay una diferencia suficiente que permita descartarlas. Se observa que el valor de la AA aumenta con el valor de la temperatura de extracción (X_2) y disminuye con el valor de la relación S/L (X_3). Según estos resultados, las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3), sin embargo, los valores obtenidos en N30, y su réplica N13, indican que también hay que tener en cuenta la extracción realizada a 47,5 min de tiempo de extracción, 62,5 °C de temperatura de extracción y una relación S/L de 0,005 g/mL.

En la **Tabla 3**, se observa que el valor de AA aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 0,654 y -1,413, respectivamente. En términos cuadráticos, el valor de AA disminuye de manera significativa con el tiempo de extracción (X_1) y aumenta de manera significativa con la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes con un valor de -0,255 y 0,266, respectivamente. Finalmente, en términos de interacción no se observa significancia en ninguna de las variables. Los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3) influyen de forma altamente significativa sobre la extracción, ambas de manera lineal.

5.4.2. Actividad antioxidante mediante el método FRAP en la fracción acuosa

Los valores de AA obtenidos en la FA se encuentran entre 5,65 y 11,85 mg TROLOX/g cascari-lla, correspondientes a los experimentos N5 y N30, respectivamente. Los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus replicas N20 y N21, además de N30, y su réplica N13. Se observa que el valor de la AA varía de igual manera a lo que ocurre en FP, aumentando con el valor de la temperatura de extracción (X_2) y disminuyendo con el valor de la relación S/L (X_3). De nuevo, las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación

S/L de 0,0141 g/mL, aunque de nuevo, hay que tener en cuenta la extracción realizada a 47,5 min de tiempo de extracción, 62,5 °C de temperatura de extracción y una relación S/L de 0,005 g/mL.

Al analizar la **Tabla 3**, se observa que el valor de AA aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 0,562 y -1,164, respectivamente. En términos cuadráticos, el valor de AA disminuye significativamente con el tiempo de extracción (X_1) y con la temperatura de extracción (X_2), obteniéndose coeficientes con un valor de -0,292 y -0,264, respectivamente. Finalmente, en términos de interacción no se observa significancia en ninguna de las variables. Los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3), influyen de manera altamente significativa sobre la extracción, ambas de manera lineal.

5.4.3. *Actividad antioxidante mediante el método ABTS en la fracción orgánica*

Los valores de AA obtenidos en la FO se encuentran entre 1,30 mg y 3,73 mg TROLOX/g cascarrilla, que corresponden a los experimentos N28 y N30, respectivamente. Teniendo en cuenta la diferencia que presentan los resultados de sus réplicas, los valores más elevados se obtuvieron en los experimentos N3 y N4, y en sus réplicas N20 y N21, además de N30, y su réplica N13. Se observa que el valor de la AA varía de igual manera a lo que ocurre en FP y FA, aumentando con el valor de la temperatura de extracción (X_2) y disminuyendo con el valor de la relación S/L (X_3). De nuevo, las mejores condiciones de experimentación se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL, aunque de nuevo, hay que tener en cuenta la extracción realizada a 47,5 min de tiempo de extracción, 62,5 °C de temperatura de extracción y una relación S/L de 0,005 g/mL.

Al analizar la **Tabla 3**, se observa que el valor de AA aumenta linealmente, de forma altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y la disminución de la relación S/L (X_3), obteniéndose coeficientes de 0,226 y -0,444, respectivamente. En términos cuadráticos, el valor de AA aumenta significativamente con la relación S/L (X_3) obteniéndose un coeficiente con un valor de 0,099. Finalmente, en términos de interacción no se observa significancia en ninguna de las variables. Los coeficientes de regresión de esta fracción indican que la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3), tienen una influencia altamente significativa sobre la extracción, ambas de manera lineal.

5.4.4. Comparativa entre las diferentes fracciones

Los coeficientes de regresión significativos se aplicaron a la **Ecuación 1**, obteniendo las ecuaciones del modelo correspondientes a la determinación de AA mediante el método ABTS:

$$Y_{(FP)} = 8,898 + 0,654 X_2 - 1,413 X_3 - 0,255 X_1^2 + 0,266 X_3^2$$

$$Y_{(FA)} = 7,991 + 0,562 X_2 - 1,164 X_3 - 0,292 X_1^2 - 0,264 X_2^2$$

$$Y_{(FO)} = 1,949 + 0,226 X_2 - 0,444 X_3 + 0,099 X_3^2$$

Al analizar estas ecuaciones, junto con los datos de la **Tabla 3**, se observa que el coeficiente de regresión constante (β_0) es altamente significativo en todas las fracciones. Respecto al resto de coeficientes, en todas las fracciones se observa que el valor de AA aumenta linealmente, de manera altamente significativa con el aumento de la temperatura de extracción (X_2) y disminución de la relación S/L (X_3). En todas las fracciones se observan coeficientes cuadráticos significativos; el tiempo de extracción (X_1) en FP y FA; la temperatura de extracción (X_2) en FA, y la relación S/L (X_3) en FO. Finalmente, en términos de interacción no se observa significancia en ninguna de las variables.

En la **Figura 9** se muestra la variación de la respuesta de cada una de las fracciones. En las figuras A, B y C se observa que las dos variables que tienen una mayor influencia sobre la respuesta aumenta son la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3). A diferencia de los que ocurre en las **Figuras 7 y 8**, el tiempo de extracción (X_1) parece tener una mayor influencia. Como ejemplo, en la figura A (FP), la respuesta máxima se puede alcanzar con tiempos de extracción (X_1) entre 50-70 minutos, a una temperatura de extracción (X_2) entre 83-85 °C y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3). A estos mismos valores la respuesta disminuye con el aumento de la relación S/L. De nuevo, se observa una mayor curvatura de las líneas de contorno en las figuras A y B (FP y FA, respectivamente) como consecuencia del valor que tienen los coeficientes de regresión cuadráticos y de interacción. Por ejemplo, si se comparan los coeficientes cuadráticos y de interacción (**Tabla 3**) de FA en CFT (figura 7B) y FA en AA mediante el método ABTS (figura 9B), se observa que estos últimos tienen un mayor valor.

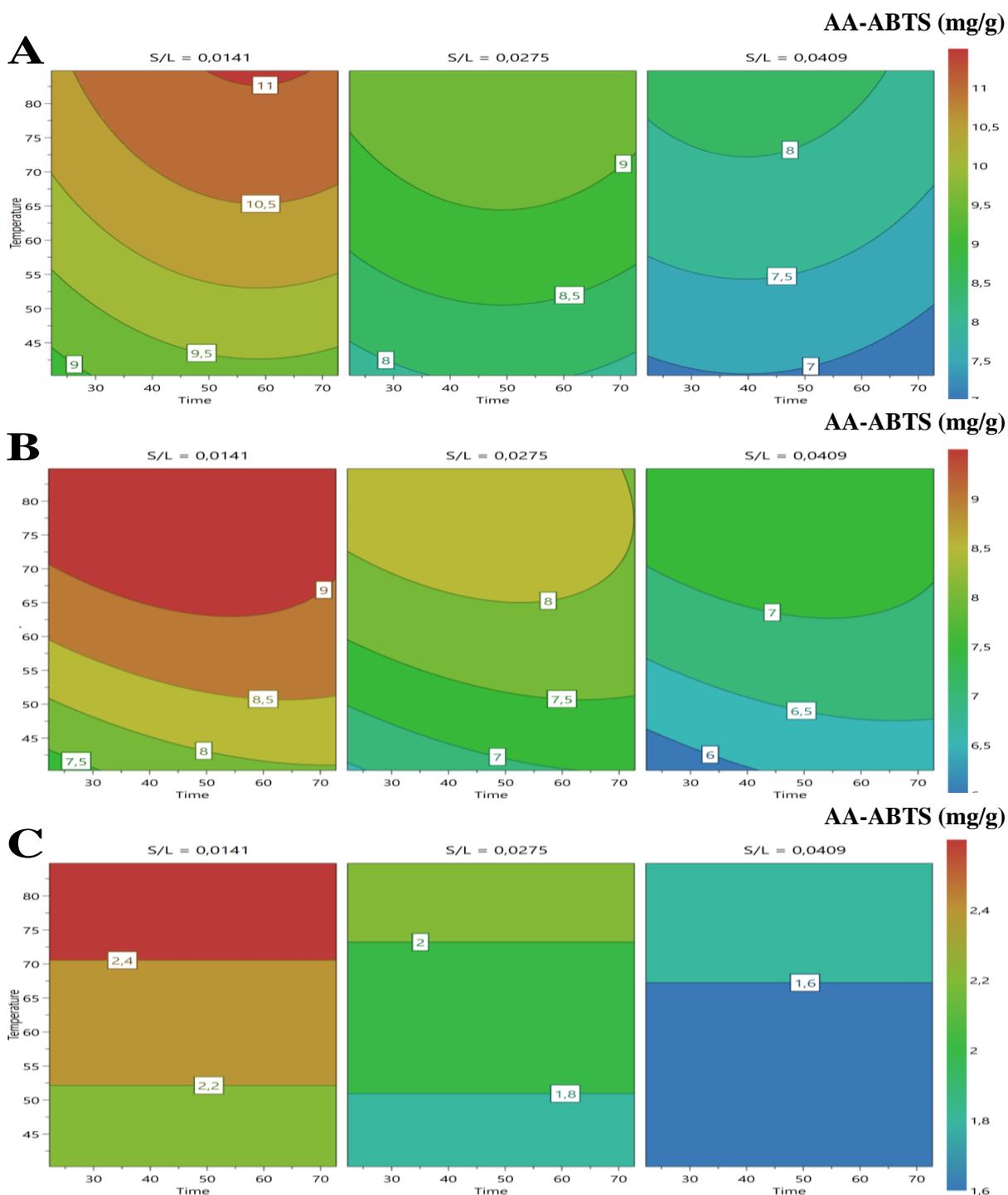


Figura 9. Variación de la respuesta del modelo (AA mediante el método ABTS) en función de las diferentes variables. (A: FP; B: FA; C: FO).

Al comparar los resultados experimentales de las tres fracciones (**Tabla 4**), al igual que ocurre en CFT y AA mediante el método FRAP, en las tres fracciones se observa que la respuesta de FP, en general, equivale a la suma de las respuestas obtenidas en FA y FO, lo que indica un buen proceso de fraccionamiento. Los valores obtenidos en estas fracciones muestran, en términos de porcentaje, que tras el fraccionamiento aproximadamente el 87% de los compuestos con AA se encuentran en la FA y el 13% restante en la FO.

5.5. Determinación de las condiciones óptimas

Tras analizar la influencia de las variables en la respuesta del modelo, finalmente se realizó el cálculo de los valores óptimos de las variables, unos valores que varían en función del objetivo deseado. Con el objetivo de maximizar la respuesta de CFT y AA, se seleccionó el peso estadístico de cada una de las fracciones, un parámetro con un límite inferior de 0,1 y superior de 1, que indica la importancia de cada fracción en la determinación de las variables. Se seleccionaron 4 objetivos diferentes, maximizar CFT y AA en: (1) todas las fracciones, (2) FP, (3) FA, y (4) FO.

En cada uno de estos objetivos, se generaron 12 combinaciones alternativas de valores de variables, cada una de ellas con un valor de Log (D), un parámetro que indica la distancia normalizada al objetivo marcado. Un valor de Log (D) inferior a 0 indica que el resultado se acerca al objetivo marcado, y un valor de -10 (límite inferior posible de este parámetro) indica que el resultado se encuentra en el objetivo. De las combinaciones generadas, se descartaron aquellas cuyos valores se alejaban mucho del rango experimental, seleccionando finalmente la que tenía mejor valor de Log (D). La predicción se realizó mediante el software MODDE 13.0. En la **Tabla 5** se muestran los pesos estadísticos seleccionados en función del objetivo deseado y los resultados de la predicción: valores óptimos de las variables y sus respuestas.

En los resultados obtenidos se puede observar como las variables con una mayor influencia sobre el modelo son la temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3), cuyos valores oscilan entre 94,8–116,4 °C y 0,006-0,009 g/mL, respectivamente. Independientemente del objetivo de la optimización, los valores óptimos de temperatura de extracción (X_2) se encuentran cercanos al máximo del rango experimental utilizado, mientras que los de relación S/L (X_3) se encuentran cercanos al mínimo.

El objetivo 1 es donde, en general, se obtienen los menores valores de respuesta. Este resultado se debe al hecho de que maximizar todas las fracciones requiere lograr una situación de compromiso entre las respuestas de todas ellas, por este motivo, los objetivos donde se maximiza una única fracción suelen tener mejores respuestas. No obstante, también hay que tener en cuenta que se trata del objetivo donde se obtiene un peor valor de Log (D). El experimento realizado (**Tabla 4**) al que más se aproxima el conjunto de valores de las variables obtenidas es este objetivo, es N3 (o su réplica N20), cuyos valores son 22,2 minutos (X_1), 84,8 °C (X_2) y 0,0141 g/mL (X_3). Este experimento es uno en los que se han observado los mayores valores de CFT y AA, independientemente de la fracción.

Tabla 5. Objetivos seleccionados para la determinación de las condiciones óptimas, valores obtenidos y respuestas del modelo.

Objetivo (n°)	1	2	3	4
Peso estadístico				
FP-CFT	1	1	0,1	0,1
FP-FRAP	1	1	0,1	0,1
FP-ABTS	1	1	0,1	0,1
FA-CFT	1	0,1	1	0,1
FA-FRAP	1	0,1	1	0,1
FA-ABTS	1	0,1	1	0,1
FO-CFT	1	0,1	0,1	1
FO-FRAP	1	0,1	0,1	1
FO-ABTS	1	0,1	0,1	1
Valores óptimos				
Log (D)	-1,34	-1,98	-2,06	-2,39
X ₁ (min)	27,86	76,77	36,36	30,85
X ₂ (°C)	94,80	100,83	99,80	116,4
X ₃ (g/mL)	0,009	0,006	0,008	0,007
Respuestas				
FP-CFT (mg/g)	6,38	6,85	6,60	6,98
FP-FRAP (μmol/g)	31,30	31,48	32,34	34,89
FP-ABTS (mg/g)	11,16	12,19	11,65	11,47
FA-CFT (mg/g)	5,12	5,29	5,25	5,31
FA-FRAP (μmol/g)	25,62	24,98	26,08	28,01
FA-ABTS (mg/g)	9,81	9,10	9,85	9,35
FO-CFT (mg/g)	1,22	1,40	1,33	1,58
FO-FRAP (μmol/g)	5,52	6,03	5,83	6,46
FO-ABTS (mg/g)	2,87	3,09	3,01	3,27

Objetivo 1: Maximizar CFT y AA en todas las fracciones; Objetivo 2: Maximizar CFT y AA en FP

Objetivo 3: Maximizar CFT y AA en FA; Objetivo 4: Maximizar CFT y AA en FO

FP: fracción pura; FA: fracción acuosa; FO: fracción orgánica

CFT: Compuestos fenólicos totales; AA: actividad antioxidante

Log (D): Distancia normalizada al objetivo marcado. X₁ = tiempo; X₂ = temperatura; X₃ = relación sólido/líquido.

En el resto de objetivos se maximizó la respuesta para cada una de las fracciones, obteniendo los siguientes conjuntos de valores de las variables (**Tabla 5**): 76,77 minutos (X₁), 100,83 °C (X₂) y 0.006 g/mL (X₃) en el objetivo 2 (FP); 36,36 minutos (X₁), 99,8 °C (X₂) y 0.008 g/mL (X₃) en el objetivo 3 (FA); y 30,85 minutos (X₁), 116,4 °C (X₂) y 0.007 g/mL (X₃) en el objetivo 3 (FO).

El objetivo 4 muestra los mejores resultados en todas las fracciones, a excepción de FP-ABTS y FA-ABTS, no obstante, hay que tener en cuenta que también es en el que se obtiene un mejor valor de Log (D). El valor obtenido en la temperatura de extracción (X₂) es mayor que el límite superior del rango experimental (100 °C), lo que dificulta el proceso de extracción, por la necesidad de trabajar en condiciones de sobrepresión. Una posible solución sería buscar una nueva alternativa de valores que mantenga una respuesta alta, siendo otra de las variables la que esté fuera del rango experimental.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Máster, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- Resulta necesario partir de un buen diseño experimental mediante DOE que optimice el número de experimentos a realizar en base a las variables y los niveles que queremos estudiar. La metodología que se ha utilizado no solo ha optimizado el tiempo y los recursos materiales, sino que también ha permitido obtener datos estadísticos de calidad.
- La aplicación de un método de fraccionamiento permite la concentración de los compuestos fenólicos en FA, mientras que en FO se concentran otros tipos de compuestos apolares, además de una pequeña fracción de compuestos fenólicos con baja polaridad.
- Los resultados experimentales de CFT indican que tras el fraccionamiento líquido-líquido aproximadamente el 85% de los compuestos fenólicos se encuentran en FA y el 15% restante en FO, lo que indica un buen proceso de fraccionamiento. Además, los resultados muestran que el 85-87% de la AA se debe a los compuestos concentrados en la FA, mientras que el 13-15% por los que se encuentran en la FO.
- Además, los resultados obtenidos nos dan información sobre los valores óptimos de las variables. Los datos muestran que las mejores condiciones para la extracción se encuentran entre 22,2-72,8 minutos de tiempo extracción (X_1), 84,8 °C de temperatura de extracción (X_2) y una relación S/L de 0,0141 g/mL (X_3). No obstante, son los coeficientes y el nivel de significancia obtenidos en el análisis estadístico y el ajuste del modelo los que permiten conocer las variables que tienen una mayor influencia sobre el proceso de extracción. Los resultados muestran que las dos variables que influyen de manera altamente significativa al proceso son temperatura de extracción (X_2) y la relación S/L (X_3), ambas de manera lineal.
- La determinación de las condiciones óptimas indican que para optimizar la extracción la mejor opción es maximizar la respuesta en una de las fracciones, siendo la FO la que mejores resultados ofrece, con unas condiciones de 30,85 minutos de tiempo de extracción (X_1), 116,4 °C y 0,007 g/mL de relación S/L.

Por lo tanto, en este Trabajo de Fin de Máster se puede concluir que aunque es necesario seguir optimizando el proceso, la extracción de compuestos con actividad antioxidante a partir de la cascarilla de café mediante un método de extracción sostenible como es el HAE es una gran oportunidad para desarrollar un proceso limpio, cuidadoso con el medio ambiente y de bajo coste para la industria alimentaria.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. *Coffee consumption worldwide from 2012/13 to 2022/23 with a forecast to 2023/24*. Disponible online: <https://www.statista.com/statistics/292595/global-coffee-consumption/> (Último acceso: 16 de julio de 2025).
2. Freitas, V.V., Borges, L.L.R., Vidigal, M.C.T.R., dos Santos, M.H., Stringheta, P.C. Coffee: A Comprehensive Overview of Origin, Market, and the Quality Process. *Trends in Food Science & Technology*. **2024**, 146, 104411. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2024.104411>
3. International Coffee Organization – Specialized Reports. Disponible online: <https://ico.org/specialized-reports/> (Último acceso: 10 de julio de 2025).
4. *Leading coffee importing countries worldwide in 2024*. Disponible online: <https://www.statista.com/statistics/1096400/main-import-countries-for-coffee-worldwide/> (Último acceso: 16 de julio de 2025).
5. Sanchez Lopez, J.; Patinha Caldeira, C.; De Laurentiis, V.; Sala, S.; Avraamides, M. Brief on Food Waste in the European Union. *European Commission*. **2020**.
6. Esquivel, P., Jiménez, V.M. Functional Properties of Coffee and Coffee By-Products. *Food Research International*. **2012**, 46, 488-495. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.028>
7. *Ley 7/2022, de 8 de abril, de residuos y suelos contaminados para una economía circular*. Boletín Oficial del Estado, **85**, de 9 de abril de 2022. Disponible online: <https://www.boe.es/eli/es/l/2022/04/08/7/con> (Último acceso: 9 de julio de 2025).
8. *Directiva (UE) 2018/851 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de mayo de 2018, por la que se modifica la Directiva 2008/98/CE sobre residuos*. Diario Oficial de la Unión Europea, **L150/109**, de 14 de junio de 2018. Disponible online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2018/851/oj> (Último acceso: 29 de agosto de 2025)
9. *Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre residuos y por la que se derogan determinadas Directivas*. Diario Oficial de la Unión Europea, **L312/3**, de 22 de noviembre de 2008. Disponible online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2008/98/oj> (Último acceso: 29 de agosto de 2025)

10. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. Boletín Oficial del Estado, **181**, de 29 de junio de 2011. Disponible online: <https://www.boe.es/eli/es/l/2011/07/28/22/con> (Último acceso: 29 de agosto de 2025)
11. León, J. Botánica de los cultivos tropicales. (Editorial Agroamérica, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1987).
12. Oliveira, G., Passos, C.P., Ferreira, P., Coimbra, M.A., Goncalves, I. Coffee By-Products and their Suitability for Developing Active Food Packaging Materials. *Foods*. **2021**, 683, 10(3). <https://doi.org/10.3390/foods10030683>
13. Iriundo-DeHond, A., Iriundo-DeHond, M., Del Castillo, M.D. Applications of Compounds from Coffee Processing By-Products. *Biomolecules*, **2020**, 10, 1219. <https://doi.org/10.3390/biom10091219>
14. Murthy, P.S., Naidu, M.M. Sustainable Management of Coffee Industry By-Products and Value Addition – A Review. *Resources, Conservation and Recycling*. **2012**, 66, 45-58. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2012.06.005>
15. Murthy, P.S., Naidu, M.M. Recovery of Phenolic Antioxidants and Functional Compounds From Coffee Industry By-Products. *Food and Bioprocess Technology*. **2012**, 5 , 897-903. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0363-z>
16. Pongsiriyakul, K., Wongsurakul, P., Kiatkittipong, W., Premashthira, A., Kuldilok, K., Najdanovic-Visak, V., Adhikari, S., Cognet, P., Kida, T., & Assabumrungrat, S. Upcycling Coffee Waste: Key Industrial Activities for Advancing Circular Economy and Overcoming Commercialization Challenges. *Processes*. **2024**, 12, 2851. <https://doi.org/10.3390/pr1212285>
17. Ludwig, I.A., Pena, M., Concepcion, C., Alan, C. Catabolism of Coffee Chlorogenic Acids by Human Colonic Microbiota. *Biofactors*. **2013**, 39, 623-632. <https://doi.org/10.1002/biof.1124>
18. Li, F., Hattori, N. Systematic Analysis of the Molecular Mechanisms Mediated by Coffee in Parkinson's Disease Based on Network Pharmacology Approach. *Journal of functional foods*. **2021**, 87, 104764. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104764>
19. Machado, C. M., Soccol, C. R., Oliveira, B. H., Pandey, A. Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2002**, 102-103, 1-6. <https://doi.org/10.1385/abab:102-103:1-6:179>

20. Flores-Solorzano, S. B., Huerta-Lwanga, E., Cuevas-González, R., Guillén-Navarro, K. Optimal conditions to produce extracts fo compost and vermicompost from oil palm and coffee pulp wastes. *Journal of Material Cycles and Waste Management*. **2022**, 24, 801-810. <https://doi.org/10.1007/s10163-022-01365-1>
21. Kasjabi, M., Mennani, M., Grimi, N., Oubenali, M., Mbarki, M., Zakhem, H., Moubarik, A. Adsorption of cationic and anionic dyes onto coffee grounds cellulose/sodium alginate double*network hydrogel beads: Isotherm analysis and recyclability performance. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2023**, 239, 124288. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124288>
22. Fernandez-Gomez, B., Lezama, A., Amigo-Benavent, M., Ullate, M., Herrero, M., Martín, M.A., Mesa, M.D., Del Castillo, M.D. Insights on the Health Benefits of the Bioactive Compounds of Coffee Silverskin Extract. *Journal of Functional Foods*. **2016**, 25, 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.001>
23. Zoccatelli, G., Ciulu, M. Perspectives on the Use of Coffee Silverskin in Food Formulations. *Journal of Agriculture and Food Research*. **2025**, 21, 101975. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101975>
24. Bresciani, L., Calani, L., Bruni, R., Brighenti, F., Del Rio, D. Phenolic Composition, Caffeine Content and Antioxidant Capacity of Coffee Silverskin. *Food Research International*. **2014**, 61, 196-201. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.047>
25. Ubando, A. T., Felix, C. B., Chen, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. *Bioresource Technology*. **2020**, 299, 122585. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122585>
26. Martins, Rodrigo., Barbosa, Ana., Advinha, B., Sales, H., Pontes, R., Nunes, R. 4. Green Extraction Techniques of Bioactive Compounds: A State-of-the-Art Review. *Processes*. **2023**, 11, 2255. <https://doi.org/10.3390/pr11082255>
27. Ameer, K., Shahbaz, H.M., Kwon, J.H. 4. Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2017**, 16, 295-315. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253>

28. Carpentieri, S., Soltanipour, F., Ferrari, G., Pataro, G., Donsi, F. 4. Emerging Green Techniques for the Extraction of Antioxidants from Agri-Food By-Products as Promising Ingredients for the Food Industry. *Antioxidants*. **2021**, 10, 1417. <https://doi.org/10.3390/antiox10091417>
29. Bhadange, Y.A., Carpenter, J., Saharan, V.K. 4. A Comprehensive Review on Advanced Extraction Techniques for Retrieving Bioactive Components from Natural Sources. *ACS Omega*. **2024**, 9, 31274-31297. <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c02718>
30. Spréa, R.M.; Caleja, C.; Pereira, E.; Carocho, M.; Pinela, J.; Finimundy, T.C.; Calhelha, R.C.; Kostić, M.; Soković, M.; Prieto, M.A.; Amaral, J.S., Barros, L. Effect of Heat-Assisted and Ultrasound-Assisted Extraction Methods on the Phenolic Profile and Biological Activity of *Thymus vulgaris* L. Extracts. *Antioxidants*. **2025**, 14, 567. <https://doi.org/10.3390/antiox14050567>
31. Weissman, S.A., Anderson, N.G. 4. Design of Experiments (DoE) and Process Optimization. A Review of Recent Publications. *Organic Process Research & Development*. 2015, 19, 1605-1633. <https://doi.org/10.1021/op500169m>
32. Dar, A. A., Yadav, P., Aswani, N., Tashi, W. A. Optimizing processes and products: The role of DOE. *Insight – Statistics*. **2024**, 7, 644. <https://doi.org/10.18282/i-s644>
33. Martono, Y., Muninggar, J. Optimization infusion condition on flavonoid and antioxidant activity of herb beverages using response surface methodology. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. **2020**, 959, 012029. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/959/1/012029>
34. Preciado-Saldaña, A. M., Domínguez-Avila, J. A., Ayala-Zavala, J. F., Villegas-Ochoa, M. A., Sáyago-Ayerdi, S. G., Wall-Medrano, A., González-Cordova, A. F., González-Aguilar, G. A. Formulation and characterization of a optimized beverage from hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) and green tea (*Camellia sinensis* L.). *Food Science and Technology International*. **2019**, 25, 547-561. <https://doi.org/10.1177/1082013219840463>
35. Salmerón-Ruiz, M. L., Domínguez-Avila, J. A., Ayala-Zavala, J. F., Alvarez-Parrilla, E., Villegas-Ochoa, M. A., Sáyago-Ayerdi, S. G., Valenzuela-Melendez, M., González-Aguilar, G. A. Optimization of a total anthocyanin content and antioxidant activity of a *Hibiscus sabdariffa* infusión using response surface methodology. *Biotechnia*. **2019**, 21, 114-122. <https://doi.org/10.18633/biotechnia.v21i2.937>

36. Usta-Gorgun, B., Yilmaz-Ersan, L., Sahin, S. Optimization of a formulation and process conditions of chestnut-based functional beverage using response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*. **2022**, 59, 3210-3219. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05475-4>
37. García, E., Fernández, I., Fuentes, A. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Etsiamn*. **2015**, 9.
38. Iris, F. F., Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. **1996**, 239, 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
39. Oki, T., Nagai, S., Yoshinaga, M., Nishiba, Y., Suda, I. Contribution of beta-Carotene to Radical Scavenging Capacity Varies among Orange-fleshed Sweet Potato Cultivars. *Food Science and Technology Research*. **2006**, 12, 156-160. <https://doi.org/10.3136/fstr.12.156>
40. Pop, A., Fizes, I., Vlase, I., Rusu, M., Cherfan, J., Babota, M., Gheldiu, A. M., Tomuta, I., Popa, D. S., De Santis, S., Corbo, F. Enhanced Recovery of Phenolic and Tocopherolic Compounds from Walnut (*Juglans Regia* L.) Male Flowers Based on Process Optimization of Ultrasonic Assisted-Extraction: Phytochemical Profile and Biological Activities. *Antioxidants*. **2021**, 10(4), 607. <https://doi.org/10.3390/antiox10040607>
41. Chadni, M., Isidore, E., Lagalle, F., Langlait, M., Dosoo, A., Ioannou, I. Optimization of the supercritical extraction of rosmarinic acid from clary sage residue and the antioxidant activity of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids*. **2023**, 193, 105830. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2022.105830>
42. Babota, M., Frumuzachi, O., Gavan, A., Iacovita, C., Pinela, J., Barros, L., Ferreira, I. C. F. R., Zhang, L., Lucini, L., Rocchetti, G., Tanase, C., Crisan, G., Mocan, A. Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from *Thymus comosus* Heuff. ex Griseb. et Schenk (wild thyme) and their bioactive potential. *Ultrasonic Sonochemistry*. **2022**, 84, 105954. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105954>
43. Eriksson, L. Design of experiments: Principles and applications. *MKS Umetrics AB*. **2008**.