

Extracción de pectina a partir de la hidrólisis ácida del cacao (*Theobroma Cacao L.*) y su aplicación en la obtención de biopelículas

Extraction of Pectin from the Acid Hydrolysis of Cocoa (*Theobroma Cacao L.*) and its Application to Obtain Biofilms

Daniel Alejandro Rodríguez Mora^{ab}, Andrés Felipe Ramírez Garcés^{ac}, Astrid del Socorro Altamar^{ad}

^a Programa de Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería, Universidad Libre, Colombia

^b daniela-rodriguez@unilibre.edu.co | <https://orcid.org/0000-0002-8051-5164>

^c andresf-ramirez@unilibre.edu.co | <https://orcid.org/0000-0003-2556-9175>

^d astridd.altamarc@unilibre.edu.co | <https://orcid.org/0000-0001-6965-7076>

Citation: Rodríguez Mora, D. A. Ramírez Garcés, A. F., y Altamar, A. del C. (2023). Extracción de pectina a partir de la hidrólisis ácida del cacao (*Theobroma Cacao L.*) y su aplicación en la obtención de biopelículas. *Mutis*, 13(1). 1-20. <https://doi.org/10.21789/22561498.1885>

Recibido: 13 de junio del 2022
Aceptado: 1 de septiembre del 2022

Copyright: © 2023 por los autores. Licenciado para *Mutis*. Este artículo es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons Attribution (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

RESUMEN

Se evaluaron diferentes condiciones experimentales para la extracción de pectina a partir de cáscaras de cacao utilizando el método de hidrólisis ácida. Se estudió el tipo de ácido clorhídrico y cítrico, y el pH a valores de 2, 3 y 4 a una temperatura constante de 90 °C; las variables respuestas fueron: rendimiento de pectina, % de metoxilo, % de esterificación, % de ácido galacturónico y meq/g de acidez. Se reportó un rendimiento de extracción promedio de ácido cítrico de 1,06 % a pH=3,0 (T2); el mayor rendimiento se dio con HCl a pH= 3,0 siendo de 1,88% (T5). La pectina fue caracterizada mediante la técnica de Owens para evaluar variables respuesta. Para el tratamiento (T2) se obtuvieron 0,78 meq/g de acidez libre, grado de esterificación del 55,02%, 2,38% de grado de metoxilo y contenido de ácido anhídrido galacturónico (AGG) del 42,48%. Adicionalmente, se realizó un análisis FTIR para caracterizar los grupos funcionales en la muestra. Basados en el análisis del diseño experimental utilizado, se seleccionó la pectina de mejores características para la fabricación de una biopelícula mediante la mezcla de pectina con glicerina como agente plastificante. Se sometió la biopelícula a prueba de biodegradabilidad aerobia, donde se obtuvo una pérdida de peso del 18,8% y producción de 53 mg de CO₂ en 5 días, mostrando una buena capacidad de biodegradabilidad.

Palabras clave: hidrólisis ácida; Pectina; biopelícula; respirometría; biodegradabilidad; ciencias naturales.

ABSTRACT

Different experimental conditions were evaluated for extracting pectin from cocoa shells using the acid hydrolysis method. The type of hydrochloric and citric acid, and the pH at values of 2, 3 and 4 at a constant temperature of 90 °C were studied. The response variables were pectin yield, % methoxyl, % esterification, % galacturonic acid and meq/g of acidity. An average citric acid extraction yield of 1.06% at pH=3.0 (T2) was reported; the highest yield resulted from HCl at pH= 3.0, being 1.88% (T5). Pectin was characterized using the Owens technique to evaluate response variables. For the

treatment (T2) 0.78 meq/g of free acidity, degree of esterification of 55.02%, 2.38% degree of methoxyl and content of anhydrous galacturonic acid (agg) of 42.48% were obtained. Additionally, a FTIR analysis was performed to characterize the functional groups in the sample. Based on the analysis of the experimental design used, the pectin with the best characteristics was selected to manufacture a biofilm by mixing pectin with glycerin as a plasticizing agent. The biofilm was subjected to an aerobic biodegradability test, with which a weight loss of 18.8% and a production of 53 mg of C_2 in 5 days were obtained, showing a good biodegradability capacity.

Keywords: Acid hydrolysis; Pectin; Biofilm; Respirometry; Biodegradability; Natural sciences.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de cacao (*Theobroma Cacao L.*) ha venido creciendo en los últimos años en Colombia debido a la demanda nacional e internacional de su grano y sus subproductos, así como a proyectos productivos impulsados en las regiones cacaoteras del país. Se estima que la producción de cacao en Colombia para el año 2021 fue de aproximadamente 69 000 toneladas, mientras que las exportaciones del grano seco de cacao y de sus productos crecieron en un 4,9% y 7,1% respectivamente, marcando un récord histórico de producción para el subsector cacaotero (Fedecacao, 2022).

En el beneficio del cacao solo es aprovechable el grano o semilla, mientras que la cáscara o mazorca es descartada y se convierte en el mayor residuo del proceso, lo cual es relevante ya que la cáscara representa entre el 74% y el 76% del peso del fruto de cacao (Vriesmann y de Olivera, 2017). Esto implica la producción de toneladas de residuos orgánicos que actualmente son aprovechados principalmente como abono en los cultivos; sin embargo, la degradación de la cáscara es lenta por lo que no es un fertilizante muy efectivo, además esta es un vector para las enfermedades causadas por *Phytophthora spp.* y *Monilophora roreri*, las cuales causan importantes pérdidas económicas al sector cacaotero (Gil, 2016).

Otra problemática asociada a las prácticas de manejo de los residuos del cacao es que la cáscara vacía en temporadas lluviosas sirve como depósitos de agua que facilitan la incubación de huevos del mosquito *Aedes aegypti*, el cual está asociado a la transmisión de enfermedades como el dengue (Sánchez *et al.*, 2009).

Actualmente se han propuesto distintos usos y aplicaciones para la cáscara de cacao desde diferentes enfoques técnicos, como la fabricación de suplementos alimentarios para ganado lechero (García, 2012), la bioadsorción de metales pesados en aguas residuales teniendo como lecho adsorbente la cáscara de cacao (Lara *et al.*, 2016) y también la obtención de pectinas para distintos usos (Guerrero *et al.*, 2017; Suarez y Orozco, 2014; Barazarte *et al.*, 2008).

Entre los posibles usos de la corteza del fruto de cacao, se destaca la extracción de pectina, una sustancia importante en la producción de alimentos como salsas, mermeladas, jaleas y bebidas por sus propiedades gelificantes (Cedeño, 2019). Esta potencialidad es un hecho de poco conocimiento en Colombia y se presenta como una oportunidad para evaluar fuentes alternativas para la extracción de sustancias pécticas a base de materias primas encontradas en el medio local y regional frente a los productos comerciales importados que suplen la totalidad de la demanda de la industria alimentaria colombiana (Montoya y Penagos, 2011).

La pectina es una sustancia con potencial para la fabricación de películas de empaquetado por sus propiedades fisicoquímicas (Villacrés *et al.*, 2018). En este aspecto se destaca la investigación de Del Águila y Zegarra (2016) como una alternativa en la fabricación de fibras plásticas biodegradables que sirvan para el embalaje de productos agrícolas. El procesamiento de los residuos es hoy en día una tendencia ambientalmente beneficiosa que toda agroindustria debe implementar para la obtención de diversos subproductos con un alto valor monetario contribuyendo a la disminución de los problemas ambientales generados por la falta de medidas acertadas. De esta manera, la extracción de las pectinas contenidas en la mazorca de cacao supondría un valor agregado para este subproducto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección del material vegetal

Se tomó una muestra de cáscaras de cacao de variedad criolla en la finca La Floresta del municipio de Falan, Tolima (Colombia) (latitud 5° 7'54.01"N, longitud 74°59'1.92" O, altitud 1170 msnm), las cuales habían sido descartadas tras realizar el proceso de despulpado del cacao, una semana antes de la selección, por lo que se escogieron las cáscaras directamente del sitio destinado a la disposición de estos residuos dentro de la finca.

Las cáscaras de cacao fueron lavadas con agua pura para remover las partículas contaminantes de mayor tamaño como tierra e insectos; después fueron desinfectadas con solución de hipoclorito de sodio diluido al 2% para terminar de eliminar los contaminantes que pueden afectar el proceso de extracción de pectina. Posteriormente, fueron secadas durante una semana en una marquesina alcanzando temperaturas de hasta 45°C para luego ser empacadas y enviadas hacia la ciudad de Bogotá D.C., en donde se realizaron los ensayos de laboratorio. Se utilizó un molino manual para triturar las cáscaras deshidratadas hasta obtener un tamaño de partícula de 420 µm (Malla 40) para facilitar la hidrólisis. Las muestras se almacenaron en un desecador hasta su uso.

Caracterización muestras de cáscaras de Cacao

Se midió la densidad de la muestra utilizando el método del Picnómetro, el cual se pesó primero vacío y luego lleno con un líquido de guía de una densidad conocida (agua destilada); luego se añadió la muestra al picnómetro (vacío y seco) y se volvió a pesar esto con el fin de conocer el peso de la muestra, para luego llenar la muestra con el agua destilada. Finalmente, se pesó por última vez el picnómetro y así se logró determinar el peso del agua destilada que se desplaza y calcular la densidad de la muestra utilizando la Ecuación 1:

$$\rho = \frac{A}{A-B} \times (\rho_0 - \rho_L) + \rho_L \quad (\text{Ec.1})$$

Donde:

ρ = densidad de la muestra

A = peso de la muestra

B = peso de la muestra en líquido

ρ_0 = densidad del líquido

ρ_L = densidad del aire

Se determinó el contenido de humedad de la cáscara seleccionada por el método gravimétrico, colocando la muestra en un horno a 105 °C durante 24 horas, registrando así la pérdida de masa de la muestra. El contenido de humedad se calculó haciendo uso de la Ecuación 2.

$$\% \text{Humedad} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} * 100\% \text{ (Ec.2)}$$

Donde:

W1 = peso inicial de la muestra

W2 = peso de muestra deshidratada

Se realizó un análisis termogravimétrico en un equipo Mettler Toledo en atmósfera inerte de nitrógeno a una tasa de calentamiento de 10 °K/min entre 25 y 850 °C. En este análisis se determina la pérdida de masa de la muestra en función de la temperatura.

Extracción de pectina

En los ensayos de hidrólisis ácida se evaluaron dos factores de estudio: el tipo de ácido (ácidos cítrico y clorhídrico) y los valores de pH (pH = 2.0, pH = 3.0 y pH = 4.0), por lo que se tuvieron seis tratamientos para cada una de las variables respuesta, como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos del diseño experimental.

Tratamiento	Tipo de ácido	Valores de pH
T ₁	Cítrico	2,0
T ₂	Cítrico	3,0
T ₃	Cítrico	4,0
T ₄	Clorhídrico	2,0
T ₅	Clorhídrico	3,0
T ₆	Clorhídrico	4,0

Fuente: elaboración propia.

Para cada ensayo se tomaron 40 g de cáscara deshidratada de cacao diluidos en 500 ml de agua acidulada ajustada a su respectivo pH (Relación 1/12,5). Las hidrólisis se realizaron en baño termostático durante 90 minutos y agitación constante. Investigaciones previas muestran la temperatura como un factor clave para la reacción de hidrólisis y se ha identificado que la temperatura óptima es de 90 °C (Guevara *et al.*, 2020; Del Águila y Zegarra, 2016). Posteriormente, las muestras fueron enfriadas hasta llegar a T=10 °C para disminuir la velocidad de la reacción de hidrólisis y evitar la degradación de la pectina por efecto de la temperatura. Una vez enfriadas las muestras, procedieron a ser filtradas por tela de liencillo. Se obtuvo la pectina en fase húmeda por precipitación alcohólica adicionando una cantidad de etanol al 96% equivalente al 80% del volumen recuperado tras la filtración. Por último, la pectina se secó a 55 °C durante 96 horas para su caracterización.

Caracterización fisicoquímica de pectina

La pectina en peso seco se caracterizó en términos de acidez libre, porcentaje de metoxilo (%ME), grado de esterificación (%GE) y porcentaje de ácido galacturónico (%AGG) mediante la técnica de Owens (Owens *et al.*, 1952; en Mendoza *et al.*, 2017). Además, se realizó análisis de FTIR con equipo Shimadzu IRAffinity-1s por método de transmisión (muestra sólida) de las pectinas obtenidas para conocer los grupos funcionales presentes graficados por el software Origin Pro.

La acidez libre es el inverso del peso equivalente, estas propiedades se cuantificaron mediante la titulación con NaOH 0,1 mol/L y se calcularon relacionando el peso de la muestra y los miliequivalentes de hidróxido de sodio gastados en la titulación (Owens *et al.*, 1952; en Mendoza *et al.*, 2017) (ecuaciones 3 y 4).

$$\text{peso Equivalente} = \frac{\text{mg Componente Acido}}{\text{meq (a) NaOH}} \quad (\text{Ec.3})$$

Dónde:

Meq A (NaOH) = meq de NaOH utilizados en la titulación
Componente ácido = mg de pectina

$$\text{Acidez Libre: } \frac{\text{meq A (NaOH)}}{\text{g Componente Acido}} \quad (\text{Ec.4})$$

Dónde:

Meq A (NaOH) = meq de NaOH utilizados en la titulación
Componente ácido = mg de pectina

El % de metoxilo se determinó con la solución empleada para la definición del peso equivalente y acidez a la cual se agregó hidróxido de sodio 0,25mol/L para desesterificar la pectina. Luego se neutralizó la solución con ácido clorhídrico 0,25mol/L y se tituló con hidróxido de sodio 0,1mol/L hasta el cambio de color a rojo, y se calculó por medio de la Ecuación 5.

$$\% \text{ Metoxilo: } \frac{\text{meq B} \cdot 31 \cdot 100}{\text{mg Componente Acido}} \quad (\text{Ec.5})$$

Dónde:

31= peso molecular del metóxido (CH₃O) expresado en mg/meq
meq B = meq de NaOH utilizados en la titulación
Componente ácido = peso de la muestra (mg)

El porcentaje de metoxilo indica la proporción de unidades de ácido anhidro galacturónico (AGG) cuyos grupos carboxilos han sido esterificados por metanol (Mejía, 2010). El grado de esterificación se midió relacionando los meq B gastados en la titulación de determinación del porcentaje de metoxilación y la suma del total de los meq A gastados en la titulación de determinación del peso equivalente y meq B; se empleó para su cálculo la Ecuación 6.

$$\% \text{ Grado De Esterificacion: } \frac{\text{meq B}}{\text{meq A} + \text{meq B}} \quad (\text{Ec.6})$$

Dónde:

meq A = miliequivalentes utilizados en la primera titulación NaOH 0,1 mol/L

meq B = miliequivalentes utilizados de NaOH 0,1 mol/L en la segunda titulación para determinar el contenido de metoxilo

El % de ácido anhidro galacturónico está altamente relacionado con la pureza de la sustancia péctica. La determinación de la acidez libre y de las unidades metiladas se relaciona mediante la Ecuación 7.

$$\% \text{ Acido Anhidrido Galacturonico: } \frac{176 \cdot 100 - (meq A + meq B)}{mg \text{ Componente Acido}} \text{ (Ec.7)}$$

Dónde:

176 = peso molecular del ácido anhídrido galacturónico expresado en mg/meq

meq A = miliequivalentes utilizados en la primera titulación con NaOH 0,1 mol/L

meq B = miliequivalentes utilizados de NaOH 0,1 mol/L en la segunda titulación para determinar el contenido de metoxilo

Componente ácido = peso de la muestra (mg)

Elaboración de la biopelícula

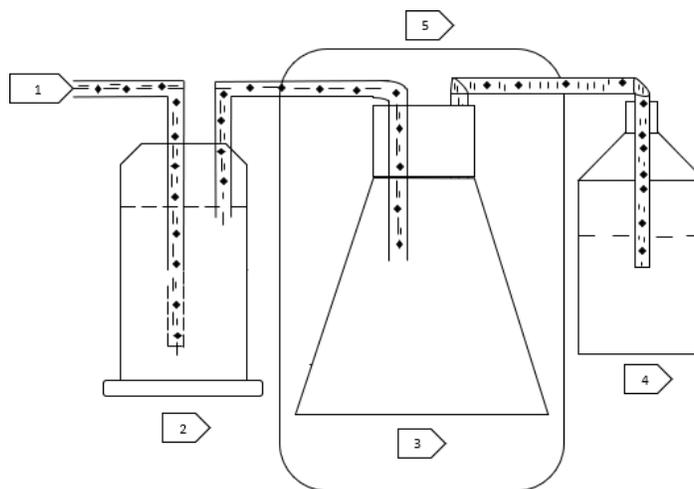
La solución para la formación del biopolímero se preparó con la pectina seleccionada (Tratamiento T₂), teniendo en cuenta el análisis del diseño experimental. Se utilizó agua destilada y glicerina vegetal como agente plastificante. Ensayos previos sobre la obtención de biopolímeros a partir de la pectina del cacao sugieren concentraciones del 3% de pectina molida y 1,5% de glicerina diluidas en agua destilada a fin de mantener la mejor proporción entre elongación y resistencia del material (Del Águila y Zegarra, 2016). Se prefiere un contenido de glicerina intermedio ya que, a mayor porcentaje de glicerina, aumentará el espesor de la película, pero irá perdiendo capacidad de elongación (Escribano, 2020). Se preparó la solución con dichas proporciones con la ayuda de una plancha de agitación magnética a 1000 RPM hasta que la mezcla presentó una viscosidad adecuada. Posteriormente, la mezcla se esparció sobre laminillas de microscopio que sirvieron como molde y fueron llevadas al horno a T = 55 °C durante 24 horas para su secado. La película obtenida se observó a través de un estereoscopio Milligram con aumento 25X con el fin de observar su estructura y la mezcla de sus componentes.

Ensayo de Biodegradabilidad

Se realizó un montaje de sistema respirométrico de acuerdo con lo previsto por la norma ISO 17556 de 2019, la cual establece una metodología para la determinación de la biodegradación aerobia de materiales plásticos en el suelo mediante una prueba que permite medir la cantidad de dióxido de carbono liberado por la acción microbiana sobre el material.

La Figura 1 muestra el diagrama del montaje respirométrico utilizado, cuyo sistema consistió en una bomba de aire conectada a una serie de frascos en los que se dio la degradación aerobia, tanto de la biopelícula como de dos materiales de prueba utilizados. Finalmente, se dio una posterior captura del dióxido de carbono emitido por la acción microbiana y se utilizó un calibrador de burbuja Gillibrator para determinar el caudal de aire suministrado por la bomba.

Figura 1. Diagrama del sistema respirométrico para la captación de CO₂: (1) Bomba de aire; (2) Frasco con NaOH en escamas; (3) Frasco con compost y material de prueba; (4) Frasco con Solución Ba (OH)₂ 0,0125M; (5) Baño termostatado.



Fuente: Elaboración propia.

Un flujo de aire se dirigió inicialmente a un frasco con escamas de NaOH para eliminar el CO₂ presente; posteriormente, fue conducido al siguiente frasco de ensayo donde se encontraba la muestra de compost con el material de prueba (fibra de polietileno no lineal de baja densidad y filtro de celulosa). Este frasco mantuvo en un baño termostatado a temperatura constante de 25 °C y se posicionó de manera que se evitara al máximo posible la incidencia de luz solar sobre el compost. Finalmente, el flujo de aire se dirigió a un último frasco con una solución de Ba (OH)₂, cuyo propósito fue el de capturar el contenido de CO₂ resultante de la biodegradación de los materiales en el frasco de ensayo para su posterior medición por titulación.

Como medio de degradación se utilizó un compost de residuos de poda y jardín con una maduración de tres meses que teniendo en cuenta su preparación estaría en el rango de caracterización típico de este tipo de materiales resultantes de un compostaje aerobio con una relación C/N de 150 (Ministerio de Vivienda, Ciudad y Territorio, 2012), el cual fue enriquecido con microorganismos activados a base de una mezcla de bacterias, levaduras, hongos entre otros microorganismos beneficiosos.

Tras cinco días de prueba de biodegradabilidad para cada material, se procedió a la medición del CO₂ capturado mediante titulación con HCl 0,05 M y fenolftaleína como indicador. La masa de CO₂ se determinó mediante la Ecuación 8.

$$m = 1,1 \times (50 - VA) \quad (\text{Ec.8})$$

Dónde:

m = masa de CO₂ en mg

VA = vol. Ácido usado en titulación

Análisis estadístico

Los datos fueron interpretados utilizando un análisis de varianza ANOVA con dos factores: el tipo de ácido a dos niveles (ácido clorhídrico y ácido cítrico) y el pH a tres valores (2, 3 y 4) teniendo como variable respuesta: rendimiento de pectina, % de metoxilo (realizando los ensayos por duplicado) y % de esterificación, % de ácido galacturónico y % de acidez, para los cuales se hicieron ensayos por triplicado. El nivel de significancia fue evaluado para un valor $p < 0.05$, empleando el software Minitab 17.3.1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización del material de cáscaras de cacao arrojó valores acordes con la literatura. En particular, el contenido de humedad es comparable con lo reportado por Ortiz & Álvarez (2015) y Herrera *et al.* (2020), los cuales obtuvieron porcentajes de humedad del 85 y 84.35% respectivamente. Los resultados obtenidos para la cáscara seleccionada se muestran en la Tabla 2.

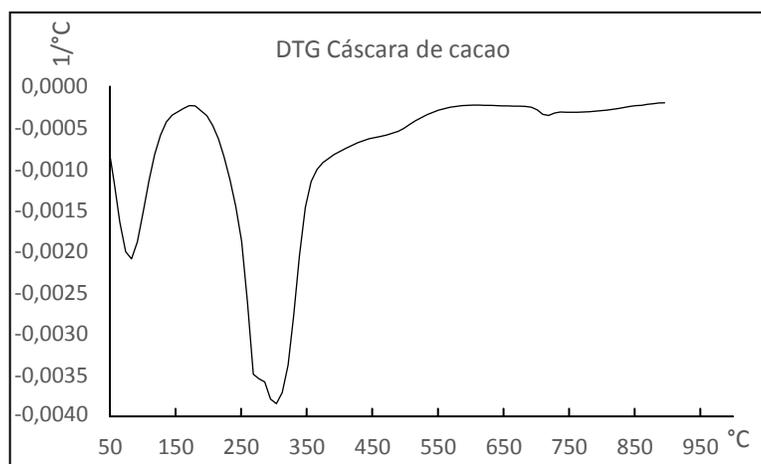
Tabla 2. Resultados de humedad y densidad de la Cáscara de cacao

Variable	Valor
Humedad (%)	82,12
Densidad (g/ml)	1,08

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del análisis termogravimétrico se muestran en la Figura 2. Teniendo en cuenta el contenido de celulosa y lignina se observa una primera zona de pérdida de masa desde la temperatura inicial hasta 120 °C aproximadamente, que se atribuye a una pérdida de volátiles y deshidratación, posteriormente se observa una segunda zona hasta aproximadamente 400 °C en la cual se realiza la descomposición de la celulosa y la hemicelulosa y el desprendimiento de materia volátil, en donde realmente se da la mayor pérdida de masa. La temperatura de máxima descomposición de la biomasa de cáscara de cacao se da a una temperatura de 304 °C, lo cual la hace una biomasa muy estable, cuyo comportamiento es corroborado con la caracterización de este tipo de materiales en la literatura (Adjin-Tetteh *et al.*, 2018).

Figura 2. Análisis termogravimétrico cáscara de cacao



Fuente: Elaboración propia.

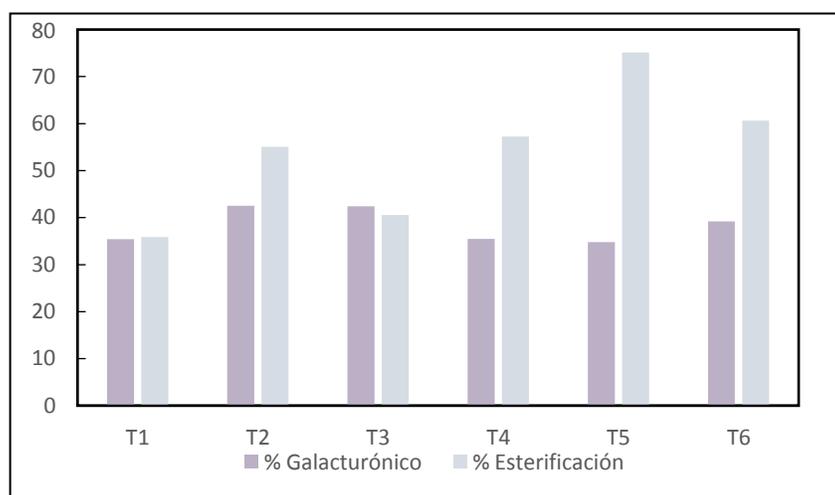
Los resultados de la caracterización fisicoquímica, según la técnica de Owens de la pectina extraída se presentan en la Tabla 3 y las figuras 3(a) y 3(b).

Tabla 3. Resultados de la caracterización fisicoquímica de la pectina.

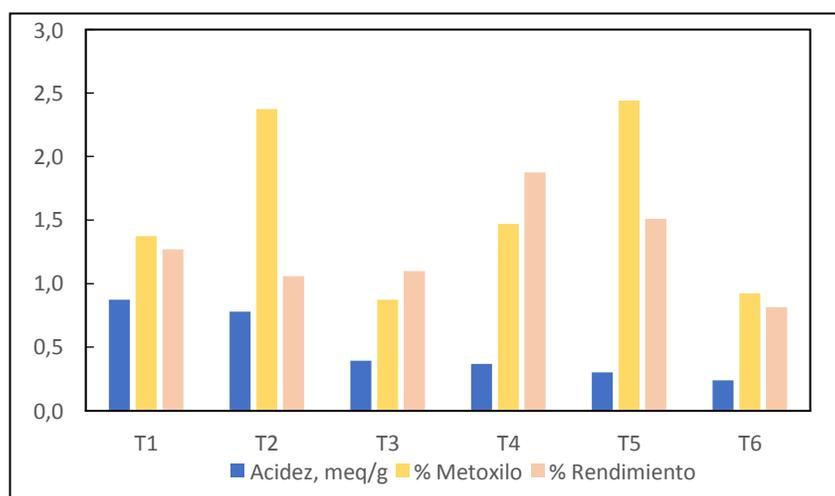
Tratamiento	% Galacturónico	% esterificación	Acidez	% Metoxilo	Rendimiento
T1	35.4 ± 0.61	35.8 ± 7.96	0.9 ± 0.19	1.4 ± 0.06	1.3 ± 0.28
T2	42.5 ± 1.30	55.0 ± 3.23	0.8 ± 0.10	2.4 ± 0.06	1.1 ± 0.07
T3	42.4 ± 1.19	40.5 ± 6.72	0.4 ± 0.02	0.9 ± 0.05	1.1 ± 0.10
T4	35.4 ± 0.88	57.2 ± 5.90	0.4 ± 0.02	1.5 ± 1.47	1.9 ± 1.88
T5	34.8 ± 0.26	75.1 ± 7.37	0.3 ± 0.06	2.4 ± 2.44	1.5 ± 1.51
T6	39.1 ± 3.54	60.6 ± 5.25	0.2 ± 0.09	0.9 ± 0.93	0.8 ± 0.82

Fuente: Elaboración propia.

Figura 3. Resultados de la caracterización de pectina. Variables analizadas por duplicado (a) y por triplicado (b)



(a)



(b)

Fuente: Elaboración propia.

Para el análisis de los datos experimentales se comprobaron los supuestos de distribución normal de los residuos, homogeneidad de varianzas y aleatorización de las corridas experimentales. Para conocer la influencia del tipo de ácido y el pH en las variables respuesta, se plantearon las siguientes hipótesis nula H_0 y alternativas H_1 :

H₀: el factor experimental (j) no tiene influencia sobre la variable respuesta (i).

H₁: el factor experimental (j) tiene influencia sobre la variable respuesta (i).

Para determinar el rechazo o aceptación de la hipótesis nula se empleó un nivel de significancia del 5% (Tabla 4).

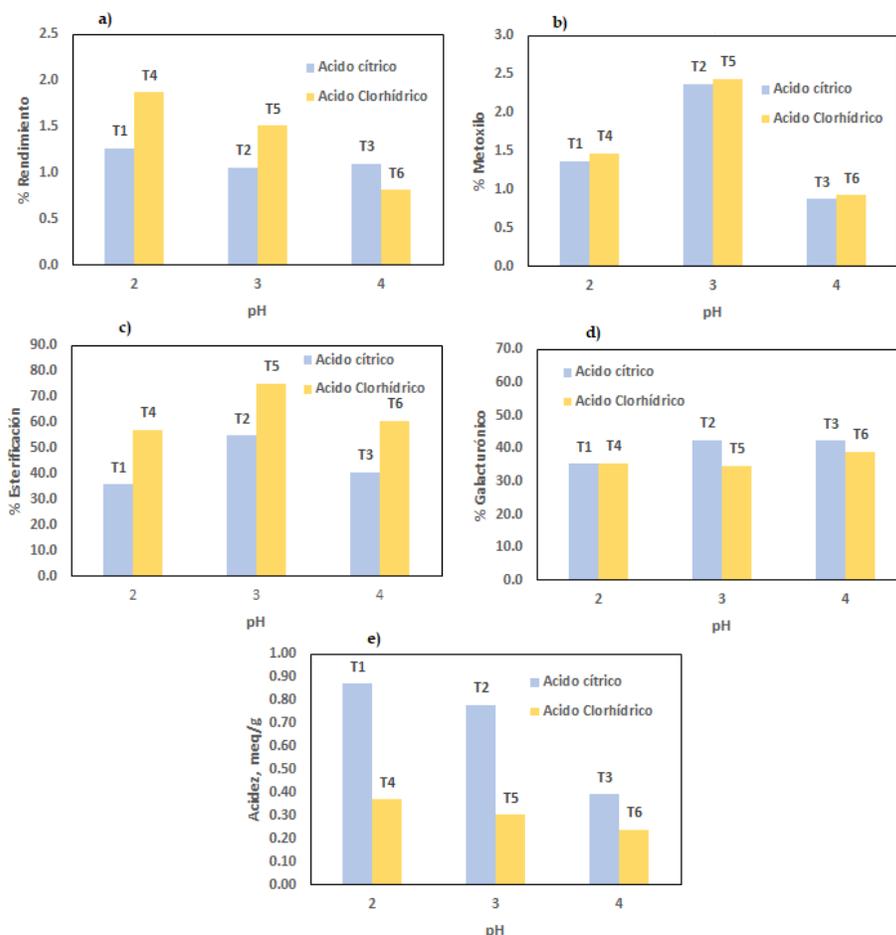
Tabla 4. Prueba de hipótesis para determinación de la influencia del tipo de ácido y pH en las variables de respuesta

Variable de respuesta (i)	Factor Experimental (j)	P-Valor
% Rendimiento	Acido	0.022
	pH	0.003
	Acido*pH	0.010
% Metoxilo	Acido	0.466
	pH	0.000
	Acido*pH	0.979
Acidez	Acido	0.000
	pH	0.001
	Acido*pH	0.017
% Acido Galacturónico	Acido	0.001
	pH	0.000
	Acido*pH	0.006
% Esterificación	Acido	0.000
	pH	0.001
	Acido*pH	0.979

Fuente: Elaboración propia.

Teniendo en cuenta el análisis ANOVA, el tipo de ácido y el pH, así como también la interacción de los dos factores ejercen influencia sobre el % de rendimiento. En el caso del % de metoxilo se rechaza la hipótesis nula para el factor experimental pH, indicando que la variación del pH incide sobre el % de metoxilo. El porcentaje de ácido galacturónico y la acidez se ven modificados por todos los factores experimentales. El porcentaje de esterificación no se ve afectado por la interacción entre el tipo de ácido y el pH (Figura 4).

Figura 4. Gráficas de efectos principales para a) % de rendimiento; b) % metoxilo, c) % de esterificación, d) % ácido galacturónico, e) Acidez.



Fuente: Elaboración propia.

Los resultados de la interacción de los factores se muestran en la Figura 4. Para evaluar el efecto del tipo de ácido y pH en el rendimiento de pectina se encontró que, de los tratamientos realizados en el laboratorio, el de mayor rendimiento fue 1,88%, el cual corresponde al uso de *HCl* como tipo de ácido donde sus condiciones fueron pH= 2; Temperatura 90 °C y 90 minutos de extracción $p < 0.005$. Los valores obtenidos son inferiores a lo reportado por Del Águila & Zegarra (2016), quienes encontraron un rendimiento promedio de 4,1%, utilizando ácido cítrico a pH= 3,0, temperatura de 90 °C y 90 minutos de hidrólisis. Cabe resaltar que para la elaboración de la biopelícula se tomó también la pectina correspondiente al tratamiento T₂ (ácido cítrico pH=3,0) el cual se escogió teniendo en cuenta las demás variables analizadas, distintas al rendimiento, ya que estas reflejan la calidad de la pectina.

Respecto a la acidez libre, Guidi y Arandia (2010) reportaron una acidez libre de 0,79 meq/g para pectina extraída de cáscaras de maracuyá. Un valor cercano fue obtenido en el tratamiento T₂ (0,78 meq/g). Se presenta una relación directa entre la acidez libre y el pH de extracción, cuyo patrón también lo describen Cabarcas *et al.* (2012). En la Figura 4e se muestra que el tipo de ácido y el pH influyen la acidez libre ($\alpha < 0.05$) encontrándose la mayor acidez a pH 2 y extracción con ácido cítrico.

El grado de esterificación fue del 55,02%; es decir, que más de la mitad de los grupos carboxilos de las unidades de AGG que conforman la cadena de pectina se esterificaron con metanol (Posada, 2019), clasificándose como una pectina de alto metoxilo (Sánchez-Aldana *et al.*, 2011). Otros análisis de pectinas extraídas por hidrólisis ácida de cacao muestran resultados de 51,31% (Rengifo *et al.*, 2019). Los resultados muestran ($\alpha < 0.05$) que los efectos principales del tipo de ácido y pH influyen la variable respuesta, pero la interacción entre los dos factores no ejerce influencia sobre el grado de esterificación. Por lo que se encuentra favorecido a un pH 3 y uso de ácido clorhídrico (Figura 4c).

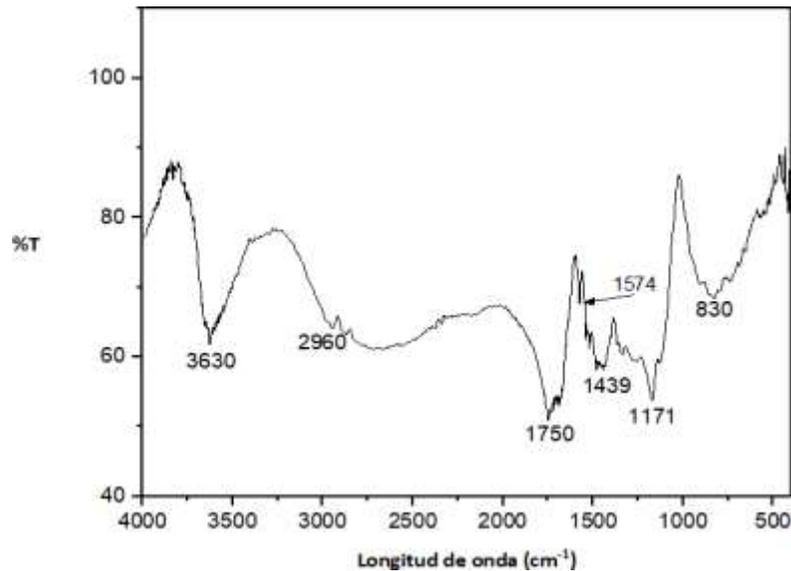
El porcentaje de metoxilo de la pectina seleccionada fue de 2,38%, clasificándose como una pectina de gelificación, lo cual coincide con otros autores. Mendoza *et al.*, (2017) obtuvieron pectina con un grado de metoxilo del 1,58%. Estos resultados corresponden a estados de maduración avanzados en los frutos seleccionados, las pectinas de alto grado de metoxilo provienen de frutos con menor tiempo de maduración ya que a mayor maduración disminuye el contenido de pectinas solubles (Púa y Barreto, 2015). El análisis de los resultados muestra ($\alpha < 0.05$) que sólo el pH influye el porcentaje de metoxilo como se muestra en la Figura 4b.

Por último, se caracterizó el contenido de ácido anhídrido galacturónico (AGG), el cual es el componente fundamental de la cadena molecular de las pectinas, que a veces también están acompañados por otros azúcares y por impurezas tales como minerales y pigmentos propios del material vegetal utilizado en la extracción (Paredes *et al.*, 2015), por lo cual es uno de los indicadores del grado de pureza de éstas (Chasquibol *et al.*, 2008), ya que permite conocer el grado de pureza de la sustancia péctica debido a que la pectina es un polisacárido constituido principalmente por el AGG con algunos de sus grupos carboxilo esterificados, aunque también en su estructura alrededor del 10% de la cadena puede representar otros azúcares, como arabinosa, glucosa y ramnosa (Mendoza, Jiménez y Ramírez, 2017). Para este parámetro se obtuvo un valor de 42,48%, lo cual es un resultado mayor al reportado por Mendoza *et al.* (2017). En este caso, con un grado de significancia de 0.05 se determinó que tanto el tipo de ácido como el pH y la interacción entre estos dos factores experimentales tienen influencia en el contenido de ácido anhídrido galacturónico (AGG) (Figura 4d).

FTIR

El espectro infrarrojo de la pectina extraída con el tratamiento T₂ (Figura 6) muestra bandas características de esta sustancia, aunque algunos picos varían ligeramente de lo reportado por otros autores.

Figura 6. Espectro infrarrojo de pectina T2 (Ácido cítrico, pH= 3,0)



Fuente: elaboración propia.

Se identificó el pico presente a los 3630 cm^{-1} como característico de grupos hidroxilo (O-H), según Muñoz, (2016) se localiza típicamente entre los 3600 y 3500 cm^{-1} . Entre las bandas 3000 y 2900 cm^{-1} se localizan las vibraciones de enlaces C-H pertenecientes a grupos alquilo (Púa y Barreto 2015). La región entre los 1750 y 1650 cm^{-1} es indicadora de grupos carboxilos libres y esterificados (Bravo y Condo, 2015), específicamente los picos de menor tamaño 1620 y 1650 cm^{-1} , son identificados por Manríquez *et al.*, (2020) como la banda de tensión asimétrica del grupo C-O-O, lo cual es característico de las pectinas de alto metoxilo. Otra de las bandas relevantes para la caracterización corresponde al ácido poligalacturónico, el cual forma la cadena principal de la estructura de la pectina. Santos *et al.*, 2013 (en Hennessey-Ramos *et al.*, 2021) identifican este grupo entre 1623 y 1428 cm^{-1} . Por último, la región entre los 1200 y los 950 cm^{-1} se considera como la huella dactilar del compuesto ya que en ella se encuentran señales típicas de diferentes polisacáridos (Hennessey-Ramos *et al.*, 2021), y también se encuentran en esta región grupos éter y enlaces carbono-carbono (Mantilla, 2020).

Caracterización de la biopelícula

Tras el proceso de secado, se obtuvo una biopelícula de color café oscuro, elástica, pero al mismo tiempo algo quebradiza; la vista estereoscópica de la película obtenida muestra manchas oscuras correspondientes a trozos de pectina no solubilizados por completo en la mezcla del biofilm (Figura 7).

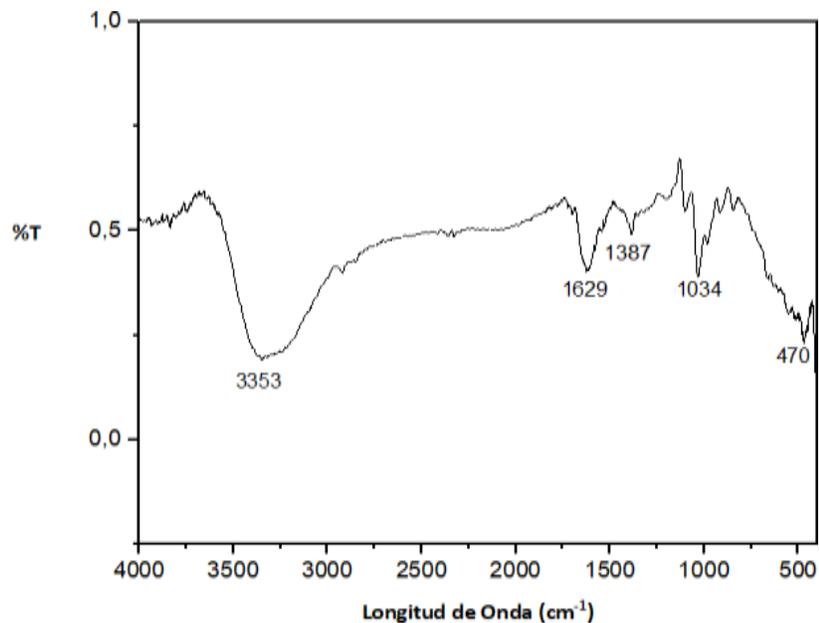
Figura 7. Vista estereoscópica de la biopelícula obtenida a partir de pectina de las cáscaras de cacao. (Aumento 25X).



Fuente: elaboración propia.

En cuanto al espectro infrarrojo de la biopelícula (Figura 8), se encontraron varias similitudes con el espectro de la pectina extraída como los enlaces O-H en 3353 cm^{-1} y el pico característico de las cadenas de AGG a los 1629 cm^{-1} . Por su parte, Meza (2016) encontró picos en 3324 cm^{-1} y 1640 cm^{-1} en un bioplástico hecho a partir de almidón de yuca y glicerina como agente plastificante. También se puede observar que desaparecen los picos de los grupos carboxilos libres y esterificados a 1750 cm^{-1} , así como cambios en los picos pertenecientes a la “huella” de la pectina. En la película se encuentran estos picos en 1387 cm^{-1} , perteneciente a grupos carboxilos (Muñoz, 2016) y en 1034 cm^{-1} , que surgen por la reacción con el glicerol formando enlaces éter C-O-C (Meza, 2016).

Figura 8. Espectro infrarrojo de la biopelícula obtenida a partir de la pectina de las cáscaras de cacao.



Fuente: elaboración propia.

Ensayo de biodegradabilidad

Se observó un flujo relativamente constante con una variación menor al 10% como recomienda la norma ISO 17556. Se determinó un flujo promedio de 1257,6 cc/min \pm 9.1815, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Determinación del caudal de aire suministrado por la bomba para el ensayo de biodegradabilidad de la biopelícula.

Lectura Flujiómetro (cc/min)	Flujo promedio (cc/min)
1246	1257,6 \pm 9.1815
1267	
1251	
1266	
1258	

Fuente: elaboración propia.

Las pruebas respirométricas de cada material tuvieron una duración de 5 días, tras los cuales se observó en cada uno de los 3 casos que en el frasco de solución de Ba(OH)₂ había pasado de ser incolora a tener un color blanquecino y se observaron también precipitados en el recipiente, claro indicador de la formación de carbonato de bario (BaCO₃) tras la captura de CO₂ producido por la degradación de los materiales. En la Tabla 6 se presenta la masa de CO₂ (mg) capturada para los tres materiales de prueba.

Tabla 6. Masa de CO₂ capturado en pruebas respirométricas

Material	CO ₂ capturado (mg)
Polietileno de baja densidad	38,46
Filtro de celulosa	48,84
Bioplástico	53,13

Fuente: elaboración propia.

El biofilm elaborado a partir de la pectina de la cáscara de cacao tuvo la mayor producción de CO₂ seguido de cerca por el filtro de celulosa y por último el polietileno de baja densidad presentó una cantidad considerablemente menor de producción de CO₂. Estos resultados presentan una tendencia similar a lo reportado por Meza (2016) que obtuvo una biopelícula a partir del almidón de yuca y es este material el que tiene una mayor biodegradabilidad por encima de la celulosa y el plástico tradicional.

Los resultados presentados por Meza (2016) muestran que, a pesar de que la cantidad de dióxido de carbono acumulado sigue creciendo con el tiempo para todos los materiales alrededor del día 25 de compostaje, la celulosa aumenta considerablemente la producción de CO₂, mientras que el bioplástico de almidón de yuca empieza a mostrar un comportamiento de meseta. Por su parte Del Águila y Zegarra (2016) reportaron una degradación del 35,57% en 5 días para una película plástica hecha a partir de pectina de cáscara de cacao cuantificando la pérdida de peso de la película en el suelo, mientras que en este trabajo se evidenció una pérdida de peso de aproximadamente 18,8% tras 5 días en condiciones de montaje respirométrico, pues se iniciaron con 0,101 g de bioplástico y se recuperaron alrededor 0,082 g al final de la prueba.

La importancia de las biopelículas obtenidas a partir de residuos del cacao como de la cáscara de la mazorca o cascarilla se deben a las abundantes plantaciones del fruto, pues las composiciones de sus residuos permiten el aprovechamiento en la obtención de bioplástico donde se prevé menor costo de materia prima (Lema, 2021).

CONCLUSIONES

Se observaron diferencias significativas en las pectinas extraídas debido a la influencia del tipo de ácido y valores de pH. Las hidrólisis con HCl presentaron mayor rendimiento en la extracción a valores bajos de pH (2,0 y 3,0) respecto a las hidrólisis realizadas con ácido cítrico. Sin embargo, las pectinas extraídas con HCl presentaron coloraciones mucho más oscuras que las extraídas con ácido cítrico lo cual indica una mayor presencia de residuos de la cáscara del cacao que afectan la calidad de las pectinas; esto se presentó en las caracterizaciones en las que las hidrólisis con ácido cítrico presentaron mayores contenidos de ácido galacturónico, principal indicador de la calidad de la pectina, razón por la cual se escogió la pectina T₂ (ácido cítrico, pH= 3,0) para la elaboración de la película plástica.

Las caracterizaciones fisicoquímicas mostraron valores similares a otros autores en varias de las propiedades analizadas, la pectina escogida se clasificó como alta en metoxilo y de baja gelificación al igual que otras de las pectinas de estudios previos que usaron cacao como materia prima.

Para la elaboración de la biopelícula es importante tener en cuenta las proporciones de pectina y glicerina para obtener la mejor relación entre elongación y espesor de la película. También es importante tener en cuenta los tiempos de secado y el recipiente en el cual se va a moldear la película para asegurar la gelificación. La capacidad de biodegradación de la biopelícula fue superior a la del polietileno y el filtro de celulosa con una pérdida de peso cercana al 20% luego de 5 días de la prueba. Los resultados de la respirometría también indican un potencial de biodegradación de la biopelícula de pectina, teniendo una buena captación de CO₂ en la prueba respirométrica respecto a los demás materiales ensayados.

RECOMENDACIONES

El color de la pectina es un indicador de la pureza de esta y se prefieren pectinas que tiendan a tonos blancos para pectinas comerciales. En este sentido, se recomiendan técnicas de blanqueamiento previas a la hidrólisis que no solo mejoren el color, sino que también contribuyen a la desactivación de enzimas pectinesterasas.

REFERENCIAS

Adjin-Tetteh, M., Asiedu, N., Dodoo-Arhin, D., Karam, A. & Amaniampong, P. N. (2018). Thermochemical conversion and characterization of cocoa pod husks a potential agricultural waste from Ghana. *Industrial Crops and Products*, 119, 304-312

Arellanes, A., Jaraba, M., Mármol, Z., Páez, G., Mazzarri, C. A. y Rincón, M. (2011). Obtención y caracterización de pectina de la cáscara del cambur manzano (Musa AAB). *Rev. Fac. Agron*, 28, 523-539

Barazarte, H., Sangronis, E. y Unai, E. (2008). La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. *Archivos Latinoamericanos de nutrición*, 58(1), 64.

Bravo Matías, A. M. y Condo Franco, E. I. (2015). *Comparación de la pectina obtenida a partir del aprovechamiento de las cáscaras de banano y cacao por el método de hidrólisis ácida* [Bachelor's thesis]. Facultad Ciencias Químicas Universidad de Guayaquil.

Cabarcas, E, Guerra, A. y Henao, C. (2012). *Extracción y caracterización de pectina a partir de cáscaras de plátano para desarrollar un diseño general del proceso de producción*. Universidad de Cartagena.

Cedeño, L. J. (2019). *Evaluación del uso de la pectina obtenida de la cáscara de cacao (Theobroma cacao L.) en la elaboración de mermelada* [Trabajo de grado]. Facultad de educación técnica para el desarrollo de la Universidad católica de Guayaquil.

Chasquibol-Silva, N., Arroyo-Benites, E. y Morales-Gomero, J. C. (2008). Extracción y caracterización de pectinas obtenidas a partir de frutos de la biodiversidad peruana. *Ingeniería Industrial*, (026), 175-199.

Chirivi Torres, N. y Palencia Suarez, G. J. (2019). *Evaluación del proceso de obtención de una biopelícula utilizando pectina extraída enzimáticamente de la cáscara de naranja valenciana* [Bachelor's tesis]. Fundación Universidad de América.

Ministerio de Vivienda, Ciudad y Territorio de Colombia (2012). TÍTULO F. Sistemas de Aseo Urbano / Viceministerio de Aguas y Saneamiento Básico. En *Reglamento Técnico del Sector de Agua Potable y Saneamiento Básico*.

Del Aguila, D. y Zegarra, D. (2016). *Extracción de pectina por hidrólisis ácida y precipitación alcohólica a partir de las cáscaras de cacao híbrido CCN51 (Theobroma cacao L.) para la fabricación de un prototipo de empaque alimentario, Pucallpa, Región Ucayali 2015* [Trabajo de grado].

Devia Pineda, J. E. (2012). Proceso para producir Pectinas Cítricas. *Revista Universidad EAFIT*, 39(129), 21–29. <https://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/revista-universidad-eafit/article/view/918>

Escribano Cajo, V. M. (2020). *Desarrollo y caracterización de un bioplástico a partir de cáscara de maracuyá (passiflora edulis)*.

Federación nacional de cacaoteros (2022). *La producción nacional cacaotera sigue creciendo: 2021 logra un nuevo record histórico*. <https://www.fedecacao.com.co/post/la-produccion-cacaotera-nacional-sigue-creciendo-en-2021-logra-un-nuevo-record-historico>

García Ojeda, T. K. (2012). *Mezcla alimenticia a partir de la cascara de cacao (theobroma cacao L.) Para la alimentación en ganado bovino de leche, Universidad Tecnológica Equinoccial, Santo Domingo* [Tesis de Licenciatura].

Gil, J. G. (2016). Pérdidas económicas asociadas a la pudrición de la mazorca del cacao causada por *Phytophthora* spp., y *Moniliophthora roreri* (Cif y Par) Evans *et al.*, en la hacienda Theobroma, Colombia. *Revista de protección vegetal*, 31(1), 42-49

Guevara, B., Avila Garavito, E. C. y Perdomo Cerquera, J. (2020). Extracción y caracterización de pectina a partir de residuos de cáscaras de piña (ananas comosus) por el método de hidrólisis ácida. *Documentos De Trabajo ECBTI*, 1(2). <https://doi.org/10.22490/ECBTI.434>

Guerrero, G., Suárez, D. y Orozco, D. (2017). Implementación de un método de extracción de pectina obtenida del subproducto agroindustrial cascarilla de cacao. *Temas agrarios*, 22(1), 85-90.

Guidi, A. & Arandia Quiroga, M. Z. (2010). Obtención de pectina a partir de la cáscara de maracuyá mediante hidrólisis ácida. *Journal Boliviano de Ciencias*, 67.

Gutiérrez Alvarez, A. I. (2019). *Biodegradación de polietileno de baja densidad utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna*.

Hennessey-Ramos, L., Murillo-Arango, W., Vasco-Correa, J. & Paz Astudillo, I. C. (2021). *Enzymatic extraction and characterization of pectin from cocoa pod husks (Theobroma cacao L.) using CelluclastMolecules*.

Herrera-Rengifo, J. D., Villa-Prieto, L., Olaya-Cabrera, A. C. y García-Alzate, L. S. (2020). Extracción de almidón de cáscara de cacao Theobroma cacao L. como alternativa de bioprospección. *Revista Ion*, 33(2), 25-34.

Lema Vera, E. (2021). Bioplásticos a partir de residuos del cacao, una alternativa para mitigar la contaminación por plástico. *Ingeniería E Innovación*, 9(1), 2021. <https://revistas.unicordoba.edu.co/index.php/rrii/article/view/240>

Lara, J., Tejada, C., Villabona, Á., Arieta, A., & Granados Conde, C. (2016). Adsorción de plomo y cadmio en sistema continuo de lecho fijo sobre residuos de cacao. *Revista Ion*, 29(2), 113-124

Loaiza Arcila, D. S. (2022). *Análisis de la aplicación de microorganismos para la degradación de plásticos* (Bachelor's thesis, Fundación Universidad de América).

Maldonado Culquimboz, Y. y Salazar Ocampo, S. M. (2010). *Extracción de pectina mediante el método de hidrólisis ácida en frutos de maushan (vasconcellea weberbaueri (harms) vm Badillo) en dos índices de madurez provenientes del distrito de San Miguel de Soloco, región Amazonas*.

Manríquez Ramírez, M. E., Corrales Luna, M., Ezeta Mejía, A., Romero Hernández, A., Cabrera Sierra, R. y Arce Estrada, E. M. (2017). *Pectina de tejocote como inhibidor de la corrosión del acero API 5LX52 en medio ácido*.

Mantilla Mantilla, M. (2020). *Caracterización de pectina extraída a partir de residuos de fruta*. Universidad de los Andes.

Márquez Cadavid, L. M. y Ledesma Chiquito, B. V. (2020). *Valorización de residuos de aguamiel del café para la obtención de polisacáridos* [Trabajo de grado].

Mejía Monroy, M. G., Dueñas Olvera, R. F. y García, D. (2021). *Evaluación de biodegradación de plásticos de un solo uso a partir de un Consorcio de Microorganismo* [Doctoral dissertation, ESPOL. FCV.]

Mejía Peralta, C. D. R. (2011). *Cuantificación, mediante infrarrojo, de la pectina residual del proceso de biotecnología de clarificación de néctar y jugo de manzana* [Bachelor's tesis]. Universidad del Azuay.

Mendoza-Vargas, L., Jiménez-Forero, J. y Ramírez-Niño, M. (2017). Evaluación de la pectina extraída enzimáticamente a partir de las cáscaras del fruto de cacao (Theobroma cacao L.). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20(1), 131-138.

Meza Ramos, P. M. (2016). *Elaboración de bioplástico a partir de almidón residual obtenido de peladoras de papa y determinación de su biodegradabilidad a nivel de laboratorio*. Universidad Nacional Agraria La Molina.

Montoya, C. G. y Penagos Gómez, C. E. (2011). *El entorno comercial de la pectina en la industria alimentaria antioqueña* [Trabajo de grado de pregrado]. Escuela de ingeniería de Antioquia.

Muñoz Labrador, A. (2016). *Caracterización de pectinas industriales de cítricos y su aplicación como recubrimientos de fresas*.

Niño, K. A., Huerta, M. E. A., Verde, M. G. R. y Rodríguez, L. A. M. (2010). *Películas biodegradables a partir de residuos de cítricos: propuesta de empaques activos*.

International Organization for Standardization (2019). *Plastics - Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide evolved (ISO 17556)*.

Orozco Velandia, K. D. y Villa Mejía, S. (2021). *Evaluación del proceso de obtención de una biopelícula a partir de pectina extraída de la pulpa de café arábica* [Trabajo de grado]. Fundación Universidad de América. <https://hdl.handle.net/20.500.11839/8689>

Ortiz Valbuena K. L. y Álvarez León R. (2015). Efecto del vertimiento de subproductos del beneficio de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre algunas propiedades químicas y biológicas en los suelos de una finca cacaotera, municipio de Yaguará (Huila, Colombia). *Boletín Científico. Centro de Museos*, 19(1), 65-84.

Paredes, J., Hernández, R. y Cañizares, A. (2015). Efecto del grado de madurez sobre las propiedades fisicoquímicas de pectinas extraídas de cascos de guayaba (*Psidium guajava* L.). *Idesia (Arica)*, 33(3), 35-41.

Posada Quintero, E. R. (2019). *Evaluación de la incidencia del método de extracción en las propiedades fisicoquímicas y reológicas de pectina obtenida de la cáscara de curuba (passiflora mollissima)*.

Pua, A. R., Barreto, G. R. y Ariza, C. S. (2015). Extracción y caracterización de la pectina obtenida a partir de la cáscara de limón Tahití (*citrus x latifolia*) en dos estados de maduración. *limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 13(2), 180- 194.

Rengifo Alava, Y. J., Macias Moreira, J. C., Mendoza Velez, S. I. y Pincay Figueroa, D. M. (2021). Evaluación de dos métodos de extracción de pectina de la cáscara de cacao (*Theobroma Cacao*). *Revista Científica Sinapsis*, 2(20). <https://doi.org/10.37117/s.v2i20.550>

Rivera, N. A. y Leal, M. C. (2004). Cinética de la hidrólisis ácida de la cascarilla de cebada. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 3(3), 257-263.

Sánchez-Aldana, D., Aguilar-González, C. N., Contreras-Esquivel, J. C. y Nevárez-Moorillón, G. V. (2011). Moléculas pécticas: extracción y su potencial aplicación como empaque. *Tecnociencia Chihuahua*, 5(2), 76-82.

Sánchez, S., Rodríguez, C., Tejada, A., Sánchez, H. y Mota, D. (2009). Susceptibilidad a insecticidas en una población de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera Culicidae) procedente de Tabasco, México. *Agrociencia*, 43(2), 173- 196.

Rodríguez Mora, D. A. Ramírez Garcés, A. F., y Altamar, A. del C. (2023). <https://doi.org/10.21789/22561498.1885>

Suárez Rozo, D. L. y Orozco Giraldo, D.M. (2014). *Obtención y caracterización de pectina a partir de la cascarilla de cacao (Theobroma cacao L). del subproducto de una industria chocolatera nacional* [Trabajo de grado]. Universidad Tecnológica de Pereira.

Vertus, D., Ruíz, M., Henriquéz, J. y Ortíz, V. (2017). Biodegradación bacteriana de polietileno y propuesta de aplicación en Cerro Patacón. *Revista de Iniciación Científica*, 3(1), 1-6.

Villacrés, N., Herrera, N. y Hernández, W. (2018). Depósito de derivados de furfural modificados en geles de pectina y la obtención de biopolímeros plásticos. *Cátedra Villarreal*, 6(2).

Vriesmann, L. C. y de Oliveira Petkowicz, C. L. (2017). Cacao pod husks as a source of low-methoxyl, highly acetylated pectins able to gel in acidic media. *International journal of biological macromolecules*, 101, 146-152.