

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del Catálogo en línea de la Biblioteca y el Repositorio Institucional en la página Web de la Biblioteca, así como en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, nunca para usos comerciales, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

**Bibliotecas Bucaramanga
Universidad Santo Tomás**

**VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBICIÓN DE LA
ACETILCOLINESTERASA DE EXTRACTOS OBTENIDOS DEL FRUTO DEL
CACAO (*THEOBROMA CACAO L*)**

KAROLL DAYANA HERRERA ROJAS

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015**

**VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBICIÓN DE LA
ACETILCOLINESTERASA DE EXTRACTOS OBTENIDOS DEL FRUTO DEL
CACAO (*THEOBROMA CACAO L*)**

KAROLL DAYANA HERRERA ROJAS

Trabajo de grado para optar el título de Químico Ambiental

Directora del Proyecto

MARTHA CERVANTES DÍAZ

Química, *M.Sc.*

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
DIVISIÓN DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
FACULTAD DE QUÍMICA AMBIENTAL
BUCARAMANGA
2015**

DEDICATORIA

A Dios por darme la sabiduría y fortaleza necesaria para culminar con éxito mi tesis. Gracias eterno Dios por hacer posible mi mayor propósito, lo que tantas veces te pedí, sin ti no hubiera sido posible terminar esta gran meta en mi vida.

A mi madre Eloyda Herrera Rojas por hacer posible mi sueño de llevar a cabo una carrera profesional, por darme el mejor ejemplo de responsabilidad y entrega, a ti más que nadie te debo cada esfuerzo ya que fuiste siempre mi motor de vida. Sé que desde el cielo celebras nuestro gran triunfo mama.

A mi padre por inculcarme el valor del orden en todos los campos de mi vida, por darme los consejos y el ánimo en los momentos que más los necesitaba, gracias.

A mi maestra por guiarme y orientarme siempre, a ella le debo el amor hacia los productos naturales.

A mis familiares, Jean y amigos por darme su apoyo incondicional en todos los aspectos y por estar siempre a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, por permitirme culminar con éxito este trabajo, me bendijo grandemente por dar con un gran equipo de trabajo y un buen estudio para mi proyecto por el cual hoy me siento muy orgullosa, toda la gloria para El.

A mi directora Martha Cervantes por brindarme la oportunidad de realizar la tesis dentro de su grupo de investigación, por su orientación, consejos y constante asesoría que recibí durante la elaboración de la misma y todo su apoyo incondicional, gracias por tantos gratos momentos.

A la Dra. Leonor Vargas por enseñarme y dedicarme parte de su tiempo en el desarrollo de las actividades biológicas de mi proyecto, para ti mi admiración.

A cada uno de mis profesores por haberme brindado su conocimiento y sus herramientas académicas necesarias para involucrarme en el desarrollo del presente trabajo.

A mi equipo de trabajo (Xiomara, Silvia y Martha), por ayudarme y orientarme en cada paso del proyecto.

Al profesor Amner Acevedo de la Universidad Uninorte de Barranquilla, departamento de Química y Biología.

A la finca en el cerro de la Aurora, por proporcionarme el cacao para mis estudios.

A mi familia, y en especial a mis padres y a mi tío Rubén, ya que ellos han sido un apoyo incondicional en toda mi vida y especialmente en este logro, mil gracias a ellos.

A Jean, por ser un apoyo incondicional en cada meta propuesta, por motivarme siempre para cumplir este sueño.

Y finalmente a todos aquellos que estuvieron pendientes de cada evolución que tuvo mi proyecto de grado y participaron de toda esta trayectoria, mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2. JUSTIFICACIÓN	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MARCO REFERENCIAL	23
4.1 Flavonoides	23
4.2 Cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>)	25
4.2.1 Generalidades del fruto de cacao	27
4.3 Métodos de obtención de los flavonoides	31
4.3.1 Espectroscopia Ultravioleta (Uv-vis):	32
4.4 Actividad Antioxidante	32
4.5 La acetilcolinesterasa (AChE):	34
4.6 MARCO DE ANTECEDENTES	36
5. DISEÑO METODOLÓGICO	39
5.1 ASPECTOS GENERALES	39
5.1.1 Disolventes y reactivos.	39
5.1.2 Equipos e instrumentos.	39
5.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	39
5.2.1 Recolección y preparación de las muestras vegetales.	39
5.2.2 Determinación del porcentaje de la humedad relativa del material vegetal.	41
5.2.3 Caracterización del material vegetal.	41
5.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LA CÁSCARA, PECTINA Y SEMILLA DEL FRUTO DE CACAO (<i>THEOBROMA CACAO L.</i>)	42
5.4 ENSAYOS DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE ACETILCCOLINESTERASA.	43
5.4.1 Determinación de fenoles totales.	43
5.4.2 Determinación de flavonoides totales.	44

5.5	DETERMINACIÓN DE LA ACITVDAD ANTIOXIDANTE, MEDIANTE EL ENSAYO DE CATIÓN RADICAL ABTS⁺	45
5.5.1	Preparación de soluciones patrón:	46
5.6	DETERMINACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ACETILCOLINAESTERASA (AChE).	48
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1	CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	50
6.2	DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD RELATIVA DEL FRUTO DE CACAO	51
6.3	OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL FRUTO DE CACAO	52
6.4	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL FRUTO DEL CACAO.	53
6.4.1	Determinación de polifenoles Totales	53
6.4.2	Determinación de Flavonoides Totales	55
6.5	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	58
6.6	DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA ENZIMA ACETILCOLINESTERASA.	63
7.	DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS	70

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Actividades biológicas más relevantes	25
Cuadro 2. Variedades de cacao <i>Theobroma cacao L</i>	26
Cuadro 3. Usos más relevantes del cacao	27

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valor nutricional de las semillas (Cacao por cada 100 g)	28
Tabla 2. Determinación de la humedad relativa del cacao	51
Tabla 3. Análisis nutricional CICTA de la semilla, cáscara y pectina	52
Tabla 4. Porcentaje de rendimiento de los extractos	53
Tabla 5. Absorbancia de la curva de calibración Acido Gálico	54
Tabla 6. Determinación de Polifenoles totales.	55
Tabla 7. Absorbancia de la curva de calibración Quercetina	56
Tabla 8. Resultados de Flavonoides totales	57
Tabla 9. Resultados actividad Antioxidante	62
Tabla 10. Relación entre compuestos fenolicos frente a la AO	64
Tabla 11. Resultados de inhibición <i>in vitro</i> de la enzima acetilcolinesterasa	67
Tabla 12. Relación entre compuestos fenólicos frente a la AChE	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de las de las diferentes sub clases de flavonoides.	23
Figura 2. Árbol de <i>Theobroma cacao</i> L	26
Figura 3. Principales productores de grano de cacao a escala mundial	27
Figura 4. Estructura interna del fruto del cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	27
Figura 5. Estructuras de la (+)-catequina y (-)-epicatequina.	30
Figura 6. Estructuras de las metilxantinas presentes en el cacao	31
Figura 7. Equipo de extracción ultrasonido (EAU) <i>Ultrasonik TM 57H</i> .	31
Figura 8. Tipos de enfermedades y daños causados por las ROS	33
Figura 9. Estructura química de la acetilcolina (ACh)	35
Figura 10. Estructura de los inhibidores de AChE disponibles comercialmente.	35
Figura 12. Extracción manual de las partes del fruto	40
Figura 13. Estado de la muestra seco.	41
Figura 14. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)..	42
Figura 15. Equipo rota evaporador acoplado a una bomba de vacío <i>IKA-RV1G Control</i> .	42
Figura 16. Espectrofotómetro UV-Vis <i>Agilent 8453</i> , empleado para la determinación de polifenoles y flavonoides totales.	44
Figura 17. Lector de microplacas de utilizado para los ensayos <i>in vitro</i> de la actividad antioxidante e inhibición de la enzima acetilcolinesterasa	45
Figura 18. Estructuras químicas de los antioxidantes naturales y sintéticos	46
Figura 19. Diseño de una microplaca de 96 pocillos para la determinación de la actividad Antioxidante.	47
Figura 20. Microplaca de 96 pocillos empleada para la determinación de la inhibición <i>in vitro</i> de la acetilcolinesterasa.	49
Figura 21. Curva de calibración de Ácido Gálico. Absorbancia vs concentración (mg/L).	53
Figura 22. Comparación del contenido de polifenoles totales de extractos de muestras frescas y secas obtenidos por diferentes métodos de extracción.	55
Figura 23. Curva de calibración de Quercetina. Absorbancia vs concentración (mg/L).	56

Figura 24. Comparación del contenido de flavonoides totales de extractos de muestras frescas y secas obtenidos de la semilla, cáscara y pectina del cacao.	57
Figura 25. Microplaca de lectura con tres muestras (α - tocoferol, BHT y BHA) por duplicado y dos filas de blancos.	58
Figura 26. Grafica de Trolox, % de inhibición vs concentración, con absorbancias medidas a los 30 min.	59
Figura 27. Graficas de la inhibición del ABTS por la Vitamina E, el BHA y el BHT, como (%) de inhibición vs concentración (ppm).	59
Figura 28. Graficas de la inhibición del ABTS por los extractos etanólicos de la (semilla, cáscara y pectina del cacao), como (%) de inhibición vs concentración.	60
Figura 29. Grafica de comparación de los valores TAA de las muestras y los antioxidantes de referencia.	61
Figura 30. Grafica del ensayo de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por la Galantamina.	64
Figura 31. Microplaca de lectura experimental con dos muestras, con diluciones seriadas A ₁ hasta A ₁₂ .Se incluyó una fila de blancos para cada muestra y dos filas de control.	64
Figura 32. Gráficas de los ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los extractos etanólicos de la (semilla, cáscara y pectina) del fruto del cacao	65

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Análisis bromatológico como caracterización del material vegetal de la semilla, cáscara y pectina del fruto de <i>Theobroma cacao L.</i>	78
Anexo B. Tabla de resultados % de humedad	79
Anexo C. Tabla de porcentaje de rendimiento de extracción	79
Anexo D. Curva de calibración de Ácido gálico	80
Anexo E. Cálculos para determinar los polifenoles totales	80
Anexo F. Resultados muestras semilla, cáscaras y pectina (PT)	82
Anexo G. Curva de calibración de Quercetina	83
Anexo H. Cálculo para determinar los flavonoides totales	83
Anexo I. Resultados muestras semilla, cáscara y pectina (FT)	85
Anexo J. Absorbancia y pesos muestras	86
Anexo K. Muestras de Acetilcolinesterasa	
Anexo L. Poster presentada en el XIX SIMPOSIO NACIONAL DE QUIMICA ORGÁNICA	87 88
Anexo M. Poster presentado en el XXII CONGRESO COLOMBIANO DE FITOQUIMICA	89

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABTS	6-sulfonato-3-etilbenzotiazolina
ACh	Acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa
AAR	Actividad antirradical
AG	Acido gálico
AO	Actividad Antioxidante
BHT	Hidroxitolueno butilado
CICTA	Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos
CL ₅₀	Concentración inhibitoria cincuenta
CO ₂	Dióxido de carbono
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo
CV	Coeficiente de variación
EA	Enfermedad de Alzheimer
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EAM	Extracción asistida por microondas
EAU	Extracción asistida por ultrasonido
Ed.	Edición
FT	Flavonoides totales
FC	Folin-Ciocalteu
FRAP	Análisis del poder reductor férrico/antioxidante
g	Gramos
GPx	Glutación peroxidasa
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
mg	Miligramos
min.	Minutos

mL	Mililitro
M	Molar
N°	Número
OH	Radical hidróxilo
ppm	Partes por millón
PT	Polifenoles Totales
RL	Radicales libres
ROO	Radical peroxilo
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TAA	Actividad antioxidante total
UIS	Universidad Industrial de Santander
UV	Radiación ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta-visible
vol.	Volumen
μL	Microlitro
μg	Microgramo
°C	Grados celsius
%	Porcentaje

GLOSARIO

ACETILCOLINESTERASA (AChE): Es una enzima del grupo de las hidrolasas, la cual está presente en la mayoría de los seres vivos, principalmente en los vertebrados incluyendo a los seres humanos, pero también en invertebrados como los insectos. Está localizada en el sistema nervioso y los músculos, y es la responsable de la regulación de la concentración de la acetilcolina (ACh).¹

ALCALOIDES: Compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno, se encuentran habitualmente en las diferentes partes de las plantas. Los alcaloides son bases y la mayoría de ellos poseen un sabor amargo y potente efectos fisiológicos.²

ANTIOXIDANTE: Los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas al terminar la propagación de la cadena de reacciones de oxidación.³

COMPUESTOS BIOACTIVOS: Tipo de sustancia química que se encuentra en pequeñas cantidades en plantas y diferente variedad de alimentos (frutas, verduras, nueces, aceites y granos integrales). Los compuestos bioactivos cumplen funciones en el cuerpo que pueden promover buena salud y prevenir varias enfermedades.⁴

ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA): Es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente, se caracteriza por el desarrollo gradual del olvido, progresando a trastornos en el lenguaje, desorientación y el mutismo.⁵

ENFERMEDAD DE PARKINSON: Enfermedad degenerativa del sistema nervioso central producida por la pérdida de neuronas y la disfunción de los circuitos neuronales relacionados con el control de los movimientos corporales.⁶

EXTRACCIÓN: Método de separación de los componentes de una mezcla basados en la diferencia de solubilidad de estas sustancias en dos líquidos no miscibles.⁷

METILXANTINAS: Se denominan como un grupo de alcaloides, estimulantes del sistema nervioso central (SNC), las metilxantinas incluyen sustancias, como la cafeína (café), la teofilina (té) y la teobromina (chocolate).⁸

NEURODEGENERACIÓN: Es el término generalizado para definir la pérdida progresiva de la estructura o función de las neuronas, incluyendo la muerte de las mismas.⁹

PECTINAS: La pectina es una fibra natural que se encuentra en las paredes celulares de las plantas y alcanza una gran concentración en las pieles de las frutas. Es muy soluble en agua y se une con el azúcar y los ácidos de la fruta para formar un gel.¹⁰

FENOL: Alcohol derivado del benceno, (hidroxibenceno) de fórmula C_6H_6OH . Sólido incoloro que funde a $41^\circ C$, se utiliza como antiséptico, desinfectante y germicida.^{7, 11}

INHIBICIÓN: Componente de los sistemas de regulación, psicológicos o fisiológicos, que actúan en los seres vivos. Puede participar a distintos niveles, por ejemplo, en el sistema nervioso, enzimático.¹²

RADICALES LIBRES (RL): Fragmento molecular muy reactivo que contiene electrones desapareados. Los radicales libres son intermediarios de gran importancia en diversos procesos y fenómenos, como la fotólisis, pirólisis, la polimerización, entre otros.¹³

SINAPSIS: Es la unión característica entre una y otra neurona. Es probablemente el sitio donde se establecen las acciones más importantes del funcionamiento del sistema nervioso.¹⁴

RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una planta perenne tropical, clasificada dentro de la familia *Malvaceae*, se considera como uno de los cultivos más importantes del planeta, puesto que, además de ser un rico alimento, se reconoce por presentar múltiples beneficios para la salud, debido a que, es una fuente rica en polifenoles.

En el presente trabajo se propuso el aprovechamiento de los residuos sólidos del fruto del cacao, para la obtención de compuestos de valor agregado tipo polifenoles y flavonoides, las muestras de estudio fueron colectadas en la Finca el Cerro de la Aurora (Lebrija, Santander).

Para la obtención de los compuestos de interés se obtuvieron extractos etanólicos del fruto (cáscaras, pectinas y semillas) en estado fresco y seco empleando la extracción con solvente asistida por ultrasonido. Se les determinó la capacidad antioxidante y los contenidos totales de flavonoides y polifenoles mediante los ensayos colorimétricos con ABTS⁺, AlCl₃ y reactivo de Folin-Ciocalteu respectivamente, también mediante un ensayo espectrofotométrico de inhibición enzimática de acuerdo con el método de Ellman, se determinó la actividad inhibitoria *in vitro* de la acetilcolinesterasa. Los rendimientos de extracción estuvieron entre 4-6%. La reactividad de los extractos de cáscaras, pectinas y semillas de cacao, hacia el catión radical ABTS⁺, mostró valores de TAA (mmol de Trolox/Kg extracto seco) entre 106,03±20 y 1426±42,64 superando en algunos casos las sustancias de referencia α -tocoferol, BHT y BHA. Por otra parte, el contenido de polifenoles totales (PT) expresado como equivalentes a ácido gálico osciló entre 5,9 y 75,7 (mg AG/g de extracto); mientras que, el contenido de flavonoides totales (FT) expresado como equivalentes se encontró entre 0,01 y 0,15 (mg quercetina/g extracto). Finalmente los resultados mostraron que los valores de Cl₅₀ de la enzima acetilcolinesterasa por parte de las fracciones analizadas se encuentran entre 19 – 37 μ g/mL. Concluyendo así a el fruto de *Theobroma cacao* L, especie forastero una fuente natural de compuestos fenólicos los cuales se encuentran presentes en mayores concentraciones en la semilla y cáscara del fruto.

PALABRAS CLAVE: Cacao; *Theobroma cacao* L, Cáscara; Semillas; Pectina; Capacidad antioxidante; ABTS⁺; Contenido total de polifenoles; Contenido total de flavonoides, Acetilcolinesterasa, Alzheimer.

ABSTRACT

Cocoa (*Theobroma cacao* L.) is a tropical evergreen plant, classified within the mallow family, is considered one of the most important crops in the world, since, besides being a rich food, is recognized for presenting multiple benefits health, because it is a rich source of polyphenols.

In this paper the use of solid waste the fruit of the cocoa, to obtain compounds of value added polyphenols type and flavonoids was proposed, the study samples were collected at the farm this Cerro the Auror (Lebrija, Santander).

To obtain the compounds of interest ethanol extracts of the fruit (peels, seeds and pectin) were obtained in a cool, dry using solvent extraction assisted by ultrasound. They determined the antioxidant capacity and total content of flavonoids and polyphenols by colorimetric tests with ABTS +., AlCl₃ and Folin-Ciocalteu respectively, also by spectrophotometric enzyme inhibition assay according to the method of Ellman, determined the in vitro inhibitory activity of acetylcholinesterase. The extraction yields were between 4-6%. Reactivity shells extracts, pectins and cocoa beans, to the radical cation ABTS +., Showed values of TAA (Trolox mmol / kg dry matter) between 20 and 1426 ± 106.03 ± 42.64 in some cases surpassing reference substances α-tocopherol, BHT and BHA. Moreover, the total polyphenol content (PT) expressed as gallic acid equivalents ranged between 5.9 and 75.7 (AG mg / g of extract); whereas, the total flavonoid content (FT) expressed as equivalent was found between 0.01 and 0.15 (mg quercetin / g extract). Finally, the results showed that the IC₅₀ values of the enzyme acetylcholinesterase by the analyzed fractions are between 19-37 ug / mL. Thus concluding to the fruit of *Theobroma cacao* L, stranger kind a natural source of phenolic compounds which are present in higher concentrations in the seed and fruit peel.

KEYWORDS: Cocoa; *Theobroma cacao* L, shell; seeds; pectin; Antioxidant capacity; ABTS⁺; Total polyphenol content; Total flavonoid content, acetylcholinesterase, Alzheimer.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se ha venido presentando una creciente demanda de estudios de polifenoles tipo flavonoides debido al interés que presentan sus propiedades biológicas tales como antibacteriales, anticancerígenas, anti-inflamatorias, antifúngicas y actividades neuroprotectoras en el uso de tratamientos en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer.¹⁵ También por sus diversas aplicaciones en la industria química para empresas de pigmentos, cosméticas y farmacéuticas entre otras^{15,16}

La industria alimenticia es la que más aprovecha el cacao, debido al procesamiento para la producción a nivel mundial de chocolate y confitería. El principal desecho que genera la industria es principalmente cáscara, que representa aproximadamente el 80 % de la masa total del fruto original. A partir de ella se pueden obtener abonos, pectinas (mermeladas) y puede usarse en concentrados.¹⁷ Además, estos desechos poseen compuestos bioactivos los cuales tienen efectos benéficos sobre la salud, tales como los polifenoles, en especial los flavonoides.^{16, 17}

Los flavonoides más representativos en el cacao (*Theobroma cacao L*) son los flavanoles, pueden estar presentes en forma de monómeros como (-)-epicatequina y (+)-catequina o oligómeros de (-) epicatequina y (+) catequina.¹⁸ Los flavonoides han demostrado ser potentes antioxidantes contra los radicales libres y quelación de metales. Esta actividad se atribuye a su capacidad donadora de hidrógeno y gracias al efecto protector que este desempeña en contra de las enfermedades ocasionadas por los radicales libres.¹⁵⁻¹⁸

También se ha demostrado que una dieta rica en polifenoles podría retardar la aparición y evolución del Alzheimer. Ello se explica porque este tipo de alimentación incrementa la producción de las células madre en el cerebro y el posterior nacimiento de nuevas neuronas.¹⁹

El proyecto que se presenta a continuación, propuso el aprovechamiento de los residuos orgánicos provenientes del cacao, teniendo como objetivo “valorar la actividad antioxidante e inhibición *in vitro* de la acetilcolinesterasa” de los extractos etánolicos obtenidos de la (cáscara, semilla y pectina) del fruto del cacao (*Theobroma cacao L*) por el método de extracción asistida con ultrasonido (UAE). También, determinar el contenido de flavonoides (FT)²⁰ y polifenoles (PT),²¹ mediante los ensayos colorimétricos con Cloruro de aluminio (AlCl₃) y Folin ciocalteu respectivamente, por medio de espectrofotometría UV- Vis. Igualmente se evaluó su actividad antioxidante por medio del ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, descrito por Re et al.²² Y finalmente se determinó la inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), por medio del método descrito por Ellman,²³ esto con el fin de desarrollar nuevos tratamientos preventivos de diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson.²⁰⁻²³

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los seres vivos naturalmente generan radicales libres como parte del proceso metabólico del organismo, pero, también puede existir un desequilibrio en la producción de los radicales libres, provocando así el llamado estrés oxidativo, el cual provoca efectos nocivos a la salud, debido a que, actúa sobre macromoléculas como (lípidos, carbohidratos, proteínas y DNA) modificando sus funciones o estructuras, generando el desarrollo de una serie de enfermedades que pueden estar asociadas con problemas cardíacos, aceleración del envejecimiento celular, algunos tipos de cánceres principalmente como colón, estómago y pulmón. También, pueden surgir afecciones neuronales principalmente como el Alzheimer, la cual afecta generalmente a personas de la tercera edad.²⁴⁻²⁶

Por lo tanto, es importante emplear agentes antioxidantes, los cuales se encargan de estabilizar e inhibir las reacciones en cadenas de los radicales, gracias a su capacidad captadora de radicales libres. En los últimos años, se ha incrementado el estudio de fuentes naturales para aislar nuevos antioxidantes, con el fin de reemplazar a los antioxidantes sintéticos, utilizados en las industrias (farmacéuticas, alimentos y cosméticas) los cuales presentan restricciones de carcinogenicidad en los seres humanos.²⁷

En relación con lo anterior, surge el interés de estudiar el cacao (*Theobroma cacao L*), el cual, tradicionalmente es explotado para el aprovechamiento de las semillas en la industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. La cáscara, mucílago y pectina del cacao, son descartados como desechos en las diferentes agroindustrias chocolateras de Colombia. Es decir, el 80% total del peso del fruto se desecha, provocando anualmente la pérdida de 12 millones de toneladas de cáscara de cacao.¹⁷

A causa de ello, se le han dado diferentes usos alternativos a estos residuos tales como: pienso para ganado, abonos orgánicos para las mismas plantaciones y como alimento saludable con diferentes propósitos. Sin embargo, en Colombia aún no se aprovecha lo suficiente este subproducto (residuos del cacao).¹⁷ A pesar de que múltiples estudios han comprobado que la semilla del fruto de cacao es la fuente principal de compuestos tipo flavonoides como (+)-catequina y (-)-epicatequina, además de poseer propiedades antioxidantes y antibacterianas.

Por lo tanto, para darle un valor agregado a los residuos del fruto del cacao se planteó estudiar cada parte de su fruto (cáscara, pectina y semilla) por separado, con el fin de probar si todas las partes del fruto poseen compuestos con actividad antioxidante, y actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa.^{17,18, 28}

2. JUSTIFICACIÓN

El cacao (*Theobroma cacao L*) y sus derivados como el chocolate son comúnmente consumidos en numerosos países y culturas de todo el mundo. En Colombia la producción de cacao se distribuye en 23 departamentos, siendo la zona nororiental constituida por Santander, Norte de Santander y Arauca donde se concentra más del 70% de la producción nacional. Por tal razón, Colombia dispone de una de las agroindustrias con mayor importancia en nuestro país, pues esta representa una importante participación en la industria de alimentos a nivel nacional.²⁹

En años recientes a nivel mundial se ha venido promoviendo el consumo de alimentos, bebidas y algunos productos cosméticos a base de especies vegetales del cacao, debido que es una de las medicinas naturales más antiguas que se conocen, las cuales, han sido utilizadas por poseer propiedades nutritivas, estimulantes, diuréticas y antiasmáticas, e incluso hoy en día sigue siendo ampliamente estudiadas por sus efectos beneficios para la salud.³⁰ El cacao se utiliza comúnmente como materia prima en la elaboración de productos comerciales que son de gran interés para las industrias alimenticias y cosméticas.¹⁶⁻¹⁷ Sin embargo en las diferentes agroindustrias, todos los componentes del cacao no son utilizados para la elaboración de chocolate, desechando las cáscaras, mucilagos y pectinas del fruto.

Los residuos generados por las diferentes industrias del sector cacaotero, son ricos en proteínas, grasas como (manteca de cacao), aminas, taninos, fosfolípidos, alcaloides incluyendo la teobromina, cafeína, dopamina, ácido nicotínico y aminoácidos libres.^{16,17} También, son fuentes significativas de polifenoles tales como (-)-epicatequina y (+)-catequina, razón por la cual, despertó un especial interés, hacia el estudio de las actividades biológicas de los polifenoles, en especial a la evaluación de la capacidad antioxidante, reconocida por su capacidad para combatir deficiencias asociadas al estrés oxidativo, tales como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, o, incluso, algunos tipos de cánceres. Asimismo intensificar la búsqueda de Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) de origen natural y sintético, menos tóxicos, con el organismo.¹⁷⁻²⁵

En función a lo expuesto anteriormente, sabemos que el fruto del cacao (*Theobroma cacao L*) representa una buena fuente de compuestos bioactivos, lo cual, hace viable su aprovechamiento, para la obtención de polifenoles tipo flavonoides a partir de los residuos orgánicos del fruto del cacao como cáscara y pectina, con el fin de darles un alto valor agregado a estos residuos. Evaluando sus propiedades biológicas para posibles usos en la industria de alimentos, cosmética, farmacéutica y agroquímica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antioxidante e inhibitoria de la acetilcolinesterasa de los extractos etanólicos en estado fresco y seco del fruto de *Theobroma cacao L* (cáscara, semilla y pectina), obtenidos mediante la extracción asistida por ultrasonido.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos etanólicos de la semilla, cáscara y pectina del *Theobroma cacao L*, en estado fresco y seco empleando el método extracción con solvente asistida con ultrasonido.
- Determinar el contenido de flavonoides totales y polifenoles totales, mediante los ensayos colorimétricos de Cloruro de aluminio y Folin ciocalteau, respectivamente.
- Evaluar la actividad antioxidante *in vitro* de los extractos etanólicos de la semilla, cáscara y pectina del *Theobroma cacao L*, mediante el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}.
- Determinar la Inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), de los extractos etanólicos de la semilla, cáscara y pectina del *Theobroma cacao L*, por medio del método de Ellman.

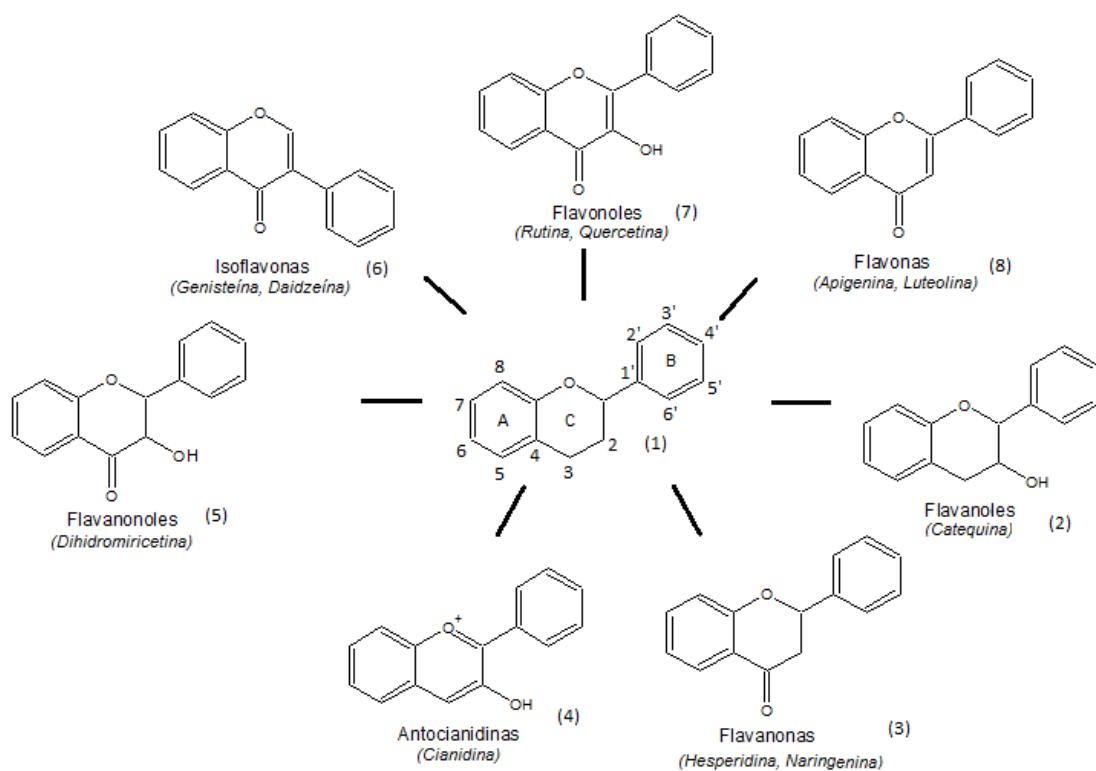
4. MARCO REFERENCIAL

4.1 Flavonoides

Los flavonoides fueron descubiertos en 1936 por el científico Albert Szent-Gyorgi. El nombró estos compuestos primero como “citrin” y más tarde como “vitamina p” Además, fue ganador del premio nobel de fisiología y medicina en el año 1937.³¹

Los flavonoides se caracterizan por tener un bajo peso molecular, ser solubles en agua caliente, alcohol y disolventes orgánicos polares. Poseen un esqueleto con quince átomos de carbono ($C_{6}C_3C_6$), el cual consta de dos anillos de tipo 2-fenilbenzopirana (A y B) (1), que van unidos a través de un anillo heterocíclico pirano (C) como se observa en la Figura 1.^{31, 32}

Figura 1. Estructura básica de las de las diferentes sub-clases de flavonoides.^{31, 33}



Fuente: Elaborado por autor.

El pirano puede variar su estructura básica por ello se le otorgan varias clasificaciones, entre ellos se encuentran los flavanoles (2), flavanonas (3), antocianidinas (4), flavanonoles (5), isoflavonas (6), flavonoles (7) y flavonas (8) (Figura 1). Estas subdivisiones varían de acuerdo con el grado de insaturación y estado de oxidación de su anillo central (C), también del número y posiciones de los grupos (OH, OMe, dioximetileno),³⁴ que dan como resultados de los diferentes sistemas conjugados.³¹

Los flavonoides se biosintetizan a través de una combinación de dos rutas diferentes, la vía de ácido shikímico y a partir de fenilalanina. Hasta la fecha se han identificado más de 5.000 flavonoides en la amplia cobertura vegetal,³¹ por lo general se encuentran distribuidos en frutas como (cítricos, manzanas, melocotones, cerezas, uvas), en verduras como (cebollas, pimientos verdes, tomates, espinacas), hojas de té, soja, vinos y frutos secos, los cuales al ser consumidos en nuestra diaria ingesta pueden mejorar el funcionamiento del organismo atenuando con algunas enfermedades que puedan presentarse.³⁴

Estos compuestos están involucrados con las características que poseen las plantas y frutos, entre ellas su sabor, dureza y color,³⁵ además, regulan su crecimiento y se encargan de proteger a la planta de los rayos UV. En algunos casos los flavonoides inhiben o matan el crecimiento de algunas cepas bacterianas, tales como la transcriptasa inversa y la proteasa, Isoflavonoides como la pisatina pueden proteger a la planta de algunas infecciones dadas por hongos.³⁵

También poseen actividad antioxidante la cual se debe a la reactividad de su grupo fenol, a la estructura en particular, a las posiciones de los grupos hidroxilo y a la naturaleza de las sustituciones en los anillos aromáticos.^{36,37}

Se han reportado más de 30 tipos de actividades biológicas para los flavonoides, dentro de las más destacadas se encuentran las actividades antivirales, anti-inflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, entre otras, las cuales se condensan en el cuadro 1.³⁴⁻³⁷

Cuadro 1. Actividades biológicas más relevantes de los flavonoides.³⁸

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	DESCRIPCIÓN	EJEMPLOS COMPUESTOS FLAVONOIDES	REF
Antioxidante	Son captadores de radicales libres, que interfieren en el proceso de propagación de los radicales libres.	antocianinas, cumarinas, lignanos, catequinas y isocatequinas.	39
Antibacterial	Capacidad que tienen los agentes químicos (flavonoides) presentes en las plantas para destruir los microorganismos patógenos o inhibir su crecimiento mediante diferentes mecanismos de acción.	quercetina, hesperitina, naringina, rutina, hesperidina, apigenina,	30
Antifúngica	Capacidad de los flavonoides para inhibir la germinación de esporas de patógenos de plantas, que se han propuesto para su uso contra patógenos fúngicos del hombre.	cloroflavona, quercetina, rutina, epicatequina, apigenina, isoflavonas.	30
Anticancerígena	Los flavonoides han demostrado clínicamente poseer efectos antimutagénicos y anticarcinogénicos, los cuales han demostrado en experimentos <i>in vitro</i> el papel esencial que tiene la quercetina, la cual inhibe las células cancerígenas, en casos específicos de cáncer de colon, mamario, urinario, gastrointestinales y leucemia.	quercetina, flavonol, kaempferol, galangina, apigenina, naringina, luteolina, catequina	34
Antiviral	Tiene como interés inhibir el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En estudios <i>in vitro</i> han demostrado que inhibe Baicalina infección y replicación.	quercetina, rutina, galangina, apigenina, naringina.	30

4.2 Cacao (*Theobroma cacao L.*)

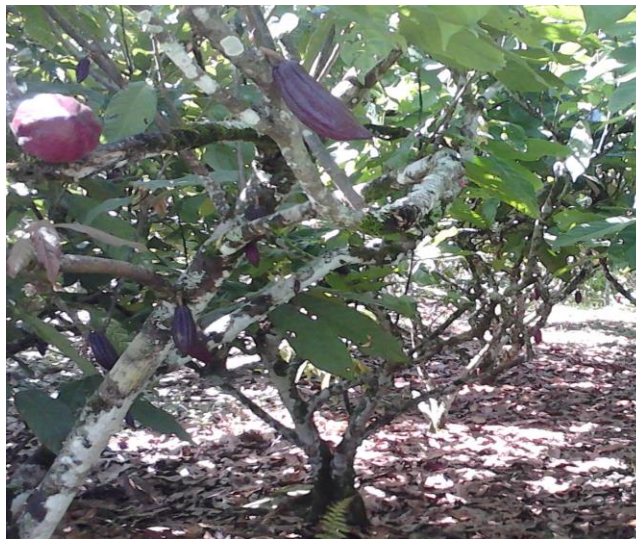
El cacao es una planta originaria de América latina, descubierta hace más de 500 años, los primeros en utilizarla fueron los aztecas de México y los mayas de América Central,⁴⁰ quienes consideraban el cacao como alimento de dioses. Se han descrito aproximadamente 22 especies a las cuales se le han atribuido muchas propiedades benéficas como: antiséptico, diurético, anti-hemorrágico y parasiticida. También, puede ser de utilidad para las quemaduras, tos, labios secos, depresión anímica.^{17, 40-42}

La clasificación Taxonómica del cacao (*Theobroma cacao L*) es la siguiente:

- Reino : *Plantae*
- Phylum : *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Orden: Malvales
- Familia: *Sterculiaceae*
- Género : *Theobroma*
- Especie: *Theobroma cacao L.*

El árbol de cacao crece preferiblemente en climas cálidos con una altura de 3 a 7 m, en su forma silvestre puede llegar a crecer hasta los 20 metros, para ello este debe crecer bajo la sombra, su copa es baja, densa y amplia. (Ver Figura 2). Esta planta puede vivir aproximadamente 40 años.⁴⁴⁻⁴⁶

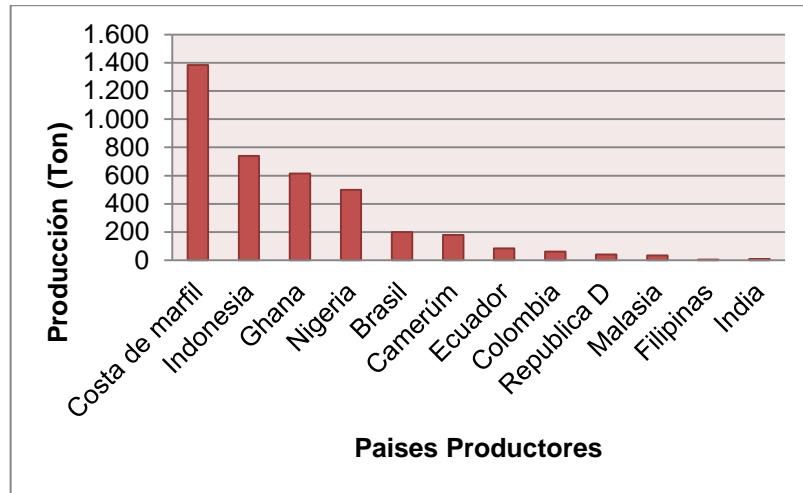
Figura 2. Cultivo de árboles de cacao (*Theobroma cacao L*)



Fuente: Elaborado por autor.

En cuanto a la distribución del *Theobroma cacao L* en el mundo, en los últimos años, la producción y comercialización mundial del cacao ha ido notoriamente en aumentando.⁴⁰ Actualmente, se encuentra distribuido en diferentes partes del mundo estimándose que países africanos como Costa de Marfil, Ghana, Nigeria y Camerún, abastecen el 72% de la producción mundial de cacao. Países como Indonesia, Nueva Guinea y Malasia son los principales productores de cacao en el continente Asiático y en Latinoamérica lo producen principalmente Brasil, Colombia, Ecuador y República Dominicana (Ver Figura 3).⁴⁴

Figura 3. Principales productores de fruto de cacao a escala mundial.⁴⁰



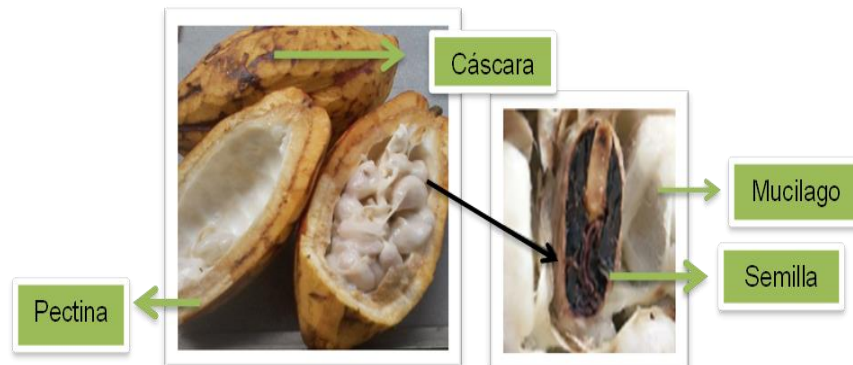
Fuente: Adaptado fedecacao⁴⁰

En Colombia, los principales departamentos que producen cacao son Santander, Huila, Arauca, Antioquia y Tolima, los cuales en conjunto suelen aportar aproximadamente el 75% de la producción nacional de cacao, lo restante de la producción corresponde a otras localidades.^{40, 44}

4.2.1 Generalidades del fruto de cacao

El fruto del cacao está compuesto por la pectina, semilla, mucilago y cáscara. La pectina del fruto del cacao es de color rosa pálido o amarillo, tiene contextura gruesa y diversas formas variables, sin embargo, esta posee forma de baya, la cual puede medir entre 30 cm de largo y 10 cm de diámetro. Las semillas generalmente se pueden encontrar más de 15 por fruto, y se caracterizan por ser de color morado oscuro, se encuentran dentro de la pulpa mucilaginoso blanca que las envuelve, la cual puede ser de color blanco o café y poseen un sabor amargo o dulce.^{47, 48} (Ver figura 4)




Figura 4. Estructura interna del fruto del cacao (*Theobroma cacao L*)



Fuente: Elaborado por autor.

Existen tres variedades de cacao, las cuales se manejan a nivel mundial y se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2. Variedades del cacao (*Theobroma cacao L.*).⁴³

VARIEDAD	CARACTERÍSTICAS
<p data-bbox="418 436 496 464">Criollo</p> 	<p data-bbox="646 531 1474 632">Cacao (<i>T. Cacao ssp.</i>), sus frutos son alargados con surcos pronunciados y semillas blancas, es un cacao de gran calidad y se reserva para la fabricación de chocolates más finos</p>
<p data-bbox="396 730 519 758">Forastero</p> 	<p data-bbox="646 779 1474 942">Cacao (<i>T. Cacao ssp. Sphaerocarpum</i>), La cual proviene regularmente de África, este fruto se caracteriza por ser redondo con surcos difícilmente visibles sus semillas son de color púrpura. Es la variedad más común, pero también la más robusta y la que da más cantidad de frutos.</p>
<p data-bbox="337 1045 578 1073">Hibrido o Trinitario</p> 	<p data-bbox="646 1094 1474 1257">Finalmente el cruce entre el delicado sabor del cacao criollo y la robustez del forastero, dio origen a un tercer tipo de variedad la cual se denomina por cacao híbrido o trinitario, este se caracteriza por una amplia variedad de formas y tamaños. Se encuentra principalmente en Colombia, Venezuela.</p>

Fuente: Elaborado por autor.

El principal uso del cacao es la producción de chocolate, también se obtienen diversas clases de subproductos para fines alimenticios, farmacéuticos, cosméticos, entre otros, como se presenta en el cuadro 3.^{49, 50}

Cuadro 3. Usos más importantes de los derivados cacao⁴²

PRODUCTO	USOS DEL CACAO Y SUS DERIVADOS
Manteca de cacao	En la Industria farmacéutica, puede actuar como (cicatrizante), en la industria cosmética en (cremas humectantes, hidratantes, jabones, champú y demás tratamientos de belleza) además se usa en la elaboración de confitería y chocolates. ⁵⁰
Pulpa de cacao	Producción de algunas bebidas alcohólicas y no alcohólicas. ⁴⁹

Jugo de cacao	de	Elaboración de jaleas y mermeladas. ⁴⁹
Polvo de cacao	de	En la industria alimenticia puede ser utilizado para cualquier alimento como chocolatinas, repostería, bebidas chocolatadas (nesquik, milo, chocolisto) mousse entre otros. ^{49,50}
Cáscara		Los usos más comunes son agregar la cáscara a las plantaciones como abono, también se suelen utilizar como alimento para el ganado, pero es necesario darle otro uso prioritario a dicho residuo debido a que en el cacao existe un compuesto llamado teobromina el cual es tóxico y restringido en diversas proporciones de consumo, para mucho animales como aves, cerdos, ovejas, cabras y ganado ¹⁷

Fuente: Elaborado por autor.

El cacao y sus derivados son ricos en micronutrientes tales como: potasio, selenio, fósforo y magnesio, es importante resaltar que el magnesio es un mineral esencial en la regulación de la presión arterial del cuerpo humano. También contiene metilxantinas y una mezcla de componentes bioactivos los cuales actúan en el organismo humano con una mayor orientación a la prevención de enfermedades degenerativas. Entre ellos, se encuentran los flavonoides (Ver figura 5). En la Tabla 1, se puede evidenciar la composición general de las semillas de cacao, reconocidas como una rica fuente de bioelementos.^{49, 50}

Tabla 1. Valor nutricional de las semillas (cacao por cada 100g).^{38, 42, 51.}

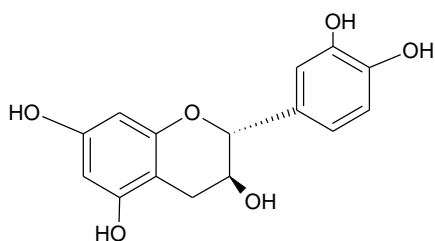
CONTENIDOS	CANTIDAD
Calorías	456 Kcal
Agua	3.6 mL
Proteínas	4.2-7.8 g
Grasas	29-30.6 g
Carbohidratos (totales)	34.7 g
Fibra	5.9-9 g
Azúcares	50.1-60 g
Sodio	0.02-0.08 g
Potasio	0.4 g
Calcio	35-63 mg
Fósforo	167-287 mg
Hierro	2.2-3.6 mg
Magnesio	100-113 mg
Zinc	1.4-2.0 mg
Vitamina A	3 UI
Vitamina E	0.25-0.3 mg
Vitamina B1	0.04-0.07mg
Vitamina B6	0.04-0.05mg
Ac. Fólico	6-10 µg

Fuente: Adaptado de instituto del cacao y chocolate.³⁸

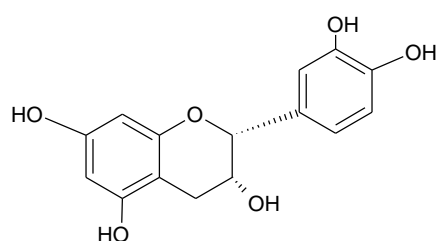
Composición química de la semilla de cacao:

En las semillas de cacao se destaca la presencia de compuestos bioactivos (flavonoles) como (+)-catequina (9) y (-)-epicatequina (10), estos son los más abundantes en el grano de cacao, estudios demuestran que la (-)-epicatequina es el compuesto predominante en el cacao, y su contenido oscila entre 34,65 y 43 mg/g (Ver figura 5).⁴⁹ La presencia de dichos compuestos fenólicos se encuentra asociada con las características organolépticas de los productos elaborados a partir de los granos de cacao. Debido que intervienen en su apariencia, color, olor, acidez. Además tiene propiedades beneficiosas para la salud humana, gracias a su actividad antioxidante.⁴⁹

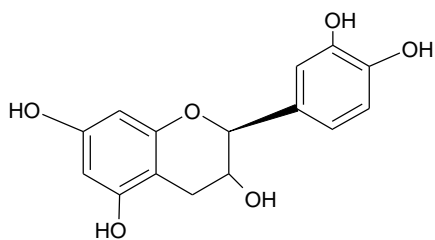
Figura 5. Estructuras de la (+)-catequina y (-)-epicatequina.⁴⁹



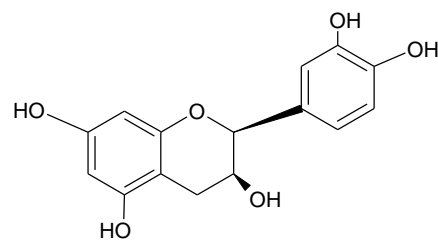
(+)-catequina (2R,3S) (9)



(-)-Epicatequina (2R, 3R) (10)



(-)- Catequina (2S, 3R) (11)

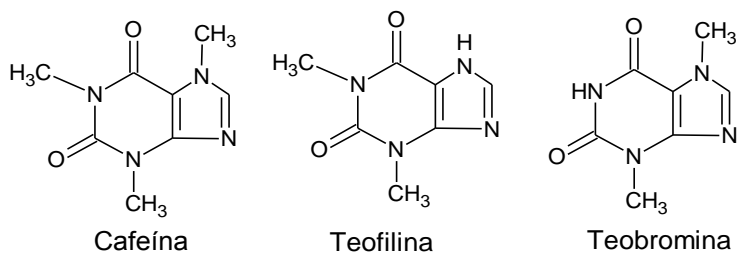


(+)-Epicatequina (2S, 3S) (12)

Fuente: Elaborado por autor.

Como se mencionó anteriormente en la semilla del cacao también podemos encontrar metilxantinas, las cuales son estimulantes del sistema nervioso central (SNC), como la cafeína (13), la teofilina (14) y teobromina (15) (figura 6).²⁶ Siendo la teobromina el principal alcaloide presente en el cacao, constituyendo aproximadamente el 4% (200mg) del fruto, este alcaloide se encarga de estimular el sistema renal. Pero, aún más atrayente parece ser la teofilina pues se reconoce como un poderoso estimulante cardiovascular, además de tener propiedades diuréticas y relajantes de los músculos bronquiales,⁴² su concentración en el cacao es muy baja con relación al contenido de cafeína que es de aproximadamente un 0,2%.(25 mg)⁴⁹

Figura 6. Estructuras de las metilxantinas presentes en el cacao⁴⁹



Fuente: Elaborado por autor.

4.3 Métodos de obtención de los flavonoides

El aislamiento de compuestos fenólicos tipo flavonoides a partir de fuentes vegetales se realiza por diferentes técnicas de extracción, pueden ser de origen tradicional como la extracción por solventes, maceración, destilación a vapor, *soxhlet* y no tradicionales como la extracción asistida por microondas, extracción por fluido supercríticos y ultrasonido, entre otras.^{52,53} La técnica que se quiere emplear en esta investigación es la extracción asistida por ultrasonido (EAU), debido que, reportes de la literatura demuestran que este método es más eficaz que los tradicionales, y aún más económico y sencillo que los de extracción no tradicional, por lo cual se comprueba su viabilidad para el desarrollo de este proyecto⁵⁴ y se describe a continuación.

Extracción asistida por ultrasonido (EAU): Esta técnica emplea sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal (flavonoides, polifenoles). Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica,⁵⁴ garantizando un contacto interno de la matriz de la muestra con la extracción disolvente. Este método cuenta con reportes en la literatura, por tener un óptimo y mejor rendimiento respecto al tiempo y a la reducción en consumo de solvente. Además de ser una de las técnicas más económicas y sencillas.⁵³⁻⁵⁵ (Ver figura 7)

Figura 7. Equipo de extracción ultrasonido (EAU) *Ultrasonik TM 57H*, disponible en el Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Química Ambiental.



Fuente: Elaborado por autor.

Además de ser muy conocido por las diferentes aplicaciones que tiene para la extracción de productos naturales, se utiliza a menudo para mejorar la extracción de lípidos, proteínas y compuestos fenólicos de las plantas.^{55, 56}

4.3.1 Espectroscopia Ultravioleta (Uv-vis):

Este Equipo permite la determinación cuantitativa de compuestos que absorben radiación electromagnética en longitudes de onda comprendidas entre 200 y 1100 nm. Usualmente se utiliza en laboratorios de análisis químico y bioquímico con el fin de determinar pequeñas cantidades de analitos.⁵⁷

4.3.2 Lector de Microplacas:

Usualmente se utiliza para la cuantificación de proteínas, ensayos de proliferación celular, ensayos ELIZA, estudio y cuantificación de enzimas. Esta técnica se basa en una fuente de luz que ilumina la muestra con una longitud de onda específica (seleccionada mediante un filtro óptico, o un monocromador) y un detector de luz. Los lectores de microplacas *EZ Read 400* son controlados por un PC usando el software Galápagos Intuitiva, creado por Biochrom, que se utiliza para el control del equipo.⁵⁸

4.4 Actividad Antioxidante

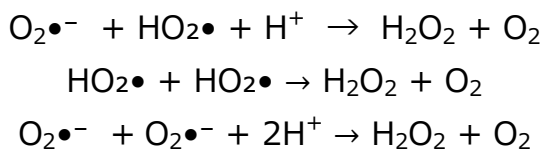
La actividad antioxidante tiene como función principal, prevenir o remediar los daños causados por el estrés oxidativo y la generación de radicales libres.⁵⁹ Se define como estrés oxidativo, al desequilibrio entre la producción de radicales libres, en las membranas celulares del cuerpo humano.⁵⁹

Un radical libre tiende a sustraer un electrón de cualquier otro átomo para compensar su deficiencia electrónica. El oxígeno, es el principal radical libre, puesto que tiene dos electrones desapareados, entre los radicales libres más destacados se encuentran:

- Radicales: ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo (OH), alcoxilo (RO), peroxilo (ROO) y óxido de nitrógeno (NO)
- No radicales: peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete O_2 y peroxinitrito (ONOO).⁶⁰

El ion superóxido es el mayor reductor, la simple adición de un protón (H^+) da lugar a la formación de HO_2^{\bullet} , convirtiéndose en un agente oxidante muy activo. Estas transformaciones se muestran en el Figura 8.^{61,62}

Figura 8. Mecanismo de acción de los radicales libres.¹⁵

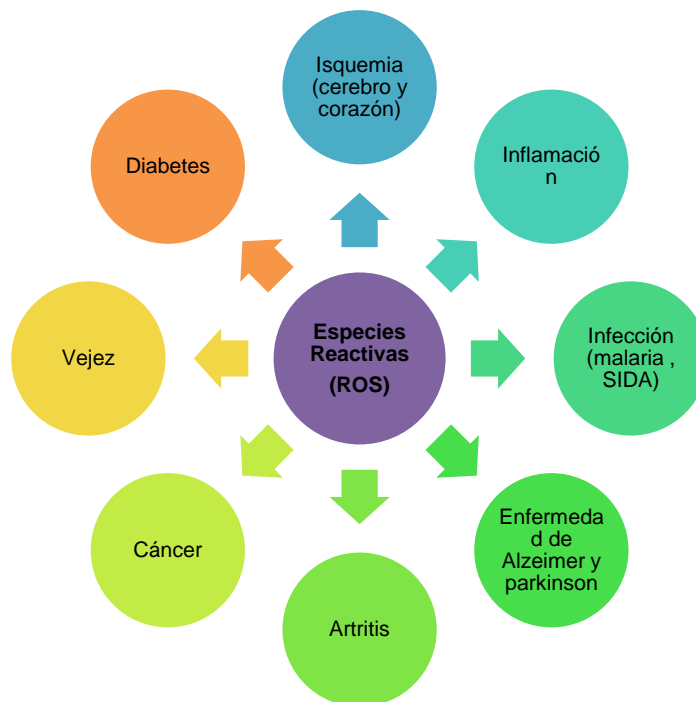


Sin embargo, los radicales libres no son moléculas que deban considerarse como perjudiciales, debido a que se forman de manera natural y continuamente en el metabolismo del cuerpo, sus fuentes de origen son endógenas, como exógenas.⁶⁰

Entre las fuentes endógenas se destaca el proceso de cadena respiratoria, en las células fagocitarias, en las reacciones donde intervienen enzimas de la familia de las NADPH oxidasas (nicotinamida adeninucleótido fosfato) y las fuentes exógenas de radicales libres pueden ser a través de la radiación solar, ozono, tabaco, los xenobióticos, drogas, aditivos, pesticidas, entre otros.⁶³

Los radicales libres (RL) son importantes para llevar a cabo diferentes reacciones enzimáticas, pero en altas concentraciones pueden provocar un desequilibrio, conllevando a daños en las biomoléculas tales como (lípidos, carbohidratos, proteínas y DNA) del organismo, alterando sus funciones y estructuras, desarrollando enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, cánceres entre otras, como se muestra en la figura 9.^{39,64,65}

Figura 9. Algunas enfermedades y daños causados por las especies reactivas del oxígeno.⁶⁵



Fuente: Elaborado por autor.

Ante los efectos dañinos de los radicales libres, el organismo responde con la defensa antioxidante.⁶⁶ Los antioxidantes naturales más comunes son los tocoferoles (vitamina E), el ácido ascórbico, los flavonoides, antocianinas, carotenoides, ácidos fenólicos. Se encuentran también los antioxidantes sintéticos

como Butilhidroxitolueno (BHT), Butilhidroxianisol (BHA). Actualmente el uso de estos compuestos sintéticos se encuentra cuestionado, puesto que diferentes estudios han demostrado que pueden causar efectos adversos tanto en animales como en humanos, asociándolos con daños pulmonares, renales, cánceres, además alergias en la piel entre otras.^{67, 68,69}

Para la búsqueda de moléculas con “actividad antioxidante”, se han propuesto varios métodos, entre ellos se encuentran los que se relacionan con la presencia de diferentes compuestos, polifenoles tipo flavonoides, los cuales se pueden determinar de acuerdo al método de Folin Ciocalteu y al método colorimétrico de $AlCl_3$ respectivamente.

Para la determinación del contenido de fenoles totales, se utiliza un método colorimétrico que aprovecha la capacidad reductora de los polifenoles que al reaccionar con el reactivo Folin-Ciocalteu, forman un complejo de coloración azulada la cual presenta una absorción a 765 nm, y se cuantifica por espectrometría ultravioleta visible realizando una curva patrón de ácido gálico. Asimismo para los flavonoides totales, se utiliza un método colorimétrico, aprovechando la reacción entre, el cloruro de aluminio y el acetato de potasio, los cuales forman un complejo coloreado que presenta una absorción a 415 nm. Los resultados son expresados como equivalentes de catequina o rutina por unidad de muestra.^{20, 21}

Los métodos más aplicados para la determinación *in vitro* de actividades antioxidante son el catión-radical ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)⁶⁶ la técnica se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical causada por la presencia de donantes de hidrógeno o de electrones, como los compuestos fenólicos. Ensayo con DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril hidracilo), desarrollado por Brand-Williams et al,⁷⁰ también la determinación por el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) entre los más conocidos.²⁹

Asimismo, se realiza la búsqueda de Inhibidores de la acetilcolinesterasa (AChE) de origen natural, con el fin de que sean menos tóxicos para el organismo humano. Por esto, se implementó en este trabajo de grado, un método para cuantificar el potencial de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, por medio de los extractos etanólicos de cacao, obtenidos mediante la extracción asistida por ultrasonido.

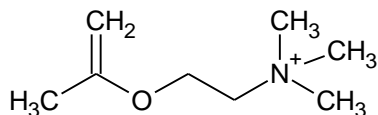
4.5 La acetilcolinesterasa (AChE):

Es conocida como una enzima crucial, la cual tiene como función fisiológica terminar el impulso nervioso en las uniones neuromusculares y sinapsis interneuronal.⁷¹

Además es responsable por el catabolismo extracelular de la acetilcolina (ACh), La acetilcolina (Ver figura 10) es uno de los principales neurotransmisores y es la

responsable de la transmisión de los impulsos eléctricos en los sistemas nerviosos central (SNC) y periférico.⁷²

Figura 10. Estructura química de la acetilcolina (ACh).⁷²

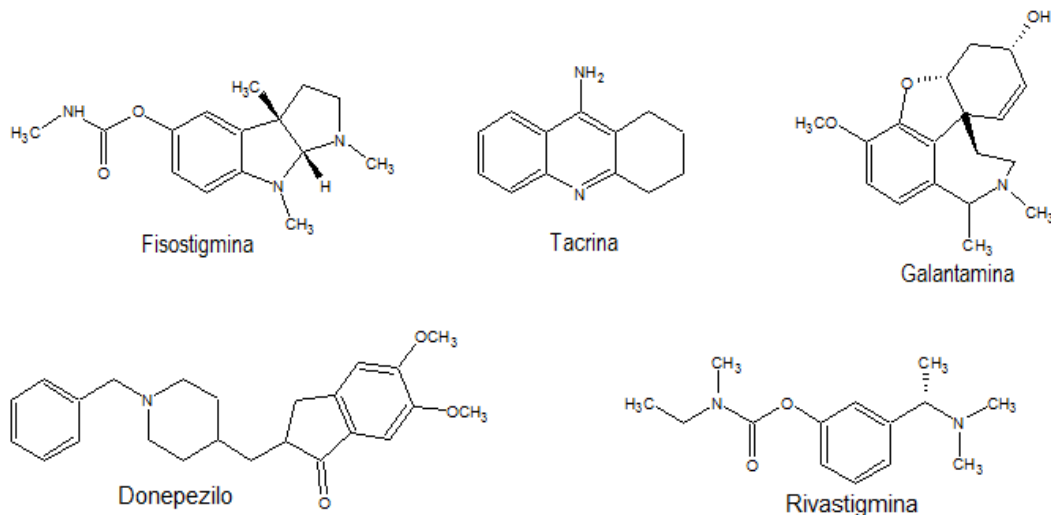


Acetilcolina

Fuente: Elaborado por autor

La acetilcolinesterasa es comúnmente utilizada en la medicina con fines terapéuticos, debido a que su actividad colinérgica puede mejorar la función cognitiva en pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA), además se utiliza con los mismos fines en enfermedades tales como: Parkison, demencia senil, ataxia, entre otras. Para su inhibición se utilizan sustancias de origen natural (galantamina, fisostigmina) o sintéticos como (tacrina, rivastigmina eserine) (Ver figura 11), también han sido utilizados compuestos organofosforados los cuales se utilizan como plaguicidas y agentes de guerra química siendo estos muy tóxicos para el organismo humano.⁷¹

Figura 11. Estructura de los inhibidores de AChE disponibles comercialmente.⁷³



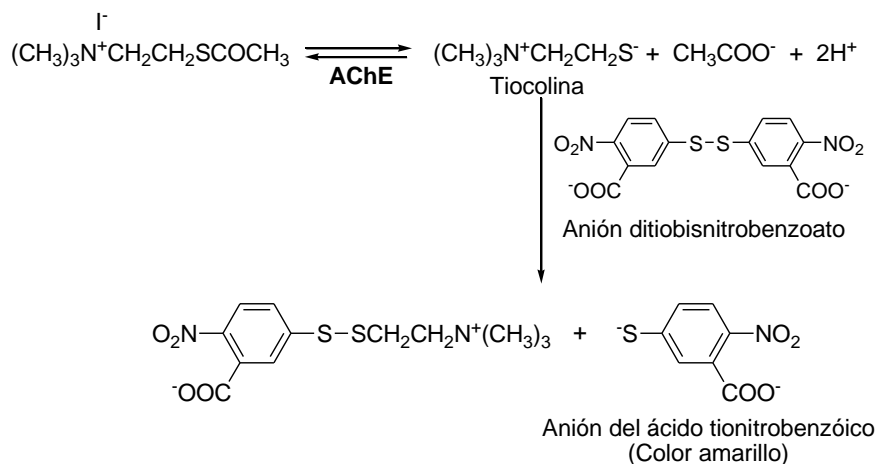
Fuente: Elaborado por autor

Por ello es importante realizar la búsqueda de extractos de plantas que puedan inhibir la AChE, para encontrar inhibidores de origen natural más potentes y que sean menos perjudiciales con el medio ambiente y la salud humana.^{71, 74}

El ensayo inicia con la medición espectrofotométrica del aumento de color amarillo producido por la tiocolina, procedente de la hidrólisis de la acetilcolina, cuando

ésta reacciona con el ión ditiobisnitrobenzoato, para formar el anión del ácido tiobisnitrobenzónico que es de color amarillo.²³ (Figura 12). La figura 36 muestra una fotografía de una microplaca de 96 pozos con la reacción entre el DTNB, Ioduro de acetilcolina y las sustancias evaluadas.

Figura 12. Reacción enzimática el método colorimétrico para determinar la actividad enzimática de la acetilcolinesterasa.²³



Fuente: Elaborado por autor.

4.6 MARCO DE ANTECEDENTES

En 1993, Griffiths, G., y colaboradores, encontraron que existe una alta actividad enzimática en los extractos de cacao, debido que, la actividad de acetilcolinesterasa muestra una producción de estearatos en semillas de cacao, mostrándose muy activas, pudiendo implicar la existencia de más de un tipo de proteasa en los frutos de cacao.⁷⁵

En el 2003, Serafini, N., y colaboradores, estudiaron el efecto protector de los flavonoides del cacao frente a las enfermedades cardiovasculares, identificando a la epicatequina como el flavonoide responsable de la actividad antioxidante. El estudio se llevó a cabo con 12 voluntarios en buen estado de salud, a quienes se les dio a consumir diferentes variedades de chocolate, observando que la absorción de epicatequina en el organismo se vio afectada con los chocolates que incluían más de un derivado de la leche en su composición.⁷⁶

En el 2007, Bayard, V., y colaboradores, realizaron un estudio de los efectos del chocolate, quienes afirman que los indios Kuna de Panamá presentan bajos niveles de enfermedades cardiovasculares, coronarias, cáncer y diabetes, debido al consumo de cuarenta tazas de chocolate semanales. Complementando este estudio en el mismo año, Michelle reporto la presencia de epicatequina en el chocolate, compuesto flavonoide responsable de la reducción de enfermedades

cardíacas, derrames cerebrales, cáncer y diabetes. La epicatequina relaja los vasos sanguíneos y mejora el flujo sanguíneo, por lo que es saludable para el corazón. Además de sus propiedades antioxidantes que pueden ayudar a prevenir el cáncer.^{77, 78}

En el 2009, Unzeta, M., y colaboradores, demostraron un mayor efecto de proliferación celular en el cerebro de ratones, suministrando a estos una dieta rica en polifenoles (cacao) durante 40 días (equivalente a cinco años en un humano). Los ratones alimentados con una dieta estándar no mostraron el mismo resultado. En ambos casos se estudiaron las dos regiones donde nacen las neuronas (el bulbo olfativo y el hipocampo) que resultan dañadas de forma especial con la enfermedad de Alzheimer. Se concluyó que una dieta basada en alimentos ricos en estas sustancias antioxidantes podría retrasar la aparición de la enfermedad o retardar su evolución.⁷⁹

En el 2010, Citadel, P., y colaboradores, desarrollaron un estudio, relacionado con los efectos antibacterianos de la pectina del *Theobroma cacao L.* La actividad de los extractos etanólicos de la pulpa de cacao fue examinada contra aislamientos bacterianos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando el método de difusión en disco. Encontrando que la pulpa de cacao es inactiva contra los aislamientos bacterianos seleccionados a una concentración de 4,000 g/ml, ya que no posee compuestos antibacterianos activos.²⁹

En el 2010, Ooshima, T., y colaboradores, evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos del cacao, los cuales mostraron actividad cariostática, inhibiendo la caries dental en ratas infectadas con *Streptococcus mutans*.⁸⁰

En el 2011, Malek, R., y colaboradores, realizaron un estudio relacionado con los efectos de la epicatequina en el mejoramiento de la resistencia a la fatiga oxidativa en los músculos del ratón, para esto suministraron pequeñas dosis de chocolate negro con (epicatequina) durante 15 días, registrando un aumento en la capacidad del metabolismo aeróbico muscular, retrasando de este modo la aparición de la fatiga. Estos descubrimientos pueden tener una clara aplicación en poblaciones clínicas que experimenten fatiga muscular, además sugirieron que un tratamiento basado en el consumo de epicatequina y ejercicio podrían retrasar la aparición del envejecimiento muscular.⁸¹

En 2012, Martínez, R., y colaboradores, desarrollaron un estudio relacionado con la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de la cáscara y mucílago del cacao (*Theobroma cacao L.*) en estado seco, la extracción se realizó con éter de petróleo mediante un equipo Soxhlet. El ensayo actividad antioxidante se llevó a cabo por medio de tres metodologías ABTS, DPPH y FRAP (Análisis del poder reductor férrico/antioxidante). Todas las muestras analizadas mostraron una alta capacidad antioxidante por medio de los tres métodos que se evaluaron, con valores que oscilan entre 2,48-22,93 μ MTrolox equivalentes (ET) / g en el ensayo ABTS; 1,57-33,93 μ MTEs / g en el ensayo de DPPH y 0,67-4,69 μ MTEs / g de la

muestra en el ensayo FRAP. Los resultados de este estudio indican que el cacao se considera como una buena fuente de compuestos naturales con actividad antioxidante significativa.⁸²

En el 2012, Cuellar, O., y colaboradores, evaluaron la actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas, Gram positivas y el hongo *E. coli* aislada del pollo, de diferentes fracciones de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*), obtenidas por extracción asistida con ultrasonido y agitación magnética, en ambos casos se utilizó una mezcla de (etanol: agua 1:1). Los resultados exhibieron una actividad antibacteriana con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 512 y 1024 ppm respectivamente. Cabe resaltar que este trabajo es el primer reporte conocido en Colombia sobre actividad antibacteriana *in vitro* de la cáscara de cacao, el cual resulta ser un avance importante de estos estudios.⁸³

Para la selección del método de extracción de los extractos etanólicos del fruto de cacao del presente estudio, se tuvo en cuenta un estudio realizado por Peralta L. y Cañizares M, publicado en la revista *Food Bioprocess Technol* en el año 2013, donde describen la extracción asistida por ultrasonido, como uno de los métodos más apropiados para la extracción de compuestos vegetales, debido que, gasta menor tiempo de extracción y reduce notoriamente el consumo de disolventes orgánicos, y no se necesita aplicar calor, que en muchos casos es responsable de la degradación térmica de algunos compuestos.⁸⁴

En el 2013, Cimini, A., y colaboradores, demostraron que los compuestos polifenólicos del cacao protegen a las neuronas por medio de la activación del FNDC (Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro) una proteína que se encarga del crecimiento y función de las neuronas, tanto en las células afectadas por placas de proteínas y oligómeros Beta-amiloideas, contrarrestando por tanto, la distrofia neural, desarrollando así nuevas expectativas sobre tratamientos preventivos frente a diversas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson.⁸⁵

En el 2014, Giulio, W., y colaboradores, evidenciaron mediante estudios realizados con ratones modificados genéticamente para imitar la enfermedad de Alzheimer, encontraron que el extracto de cacao denominado lavado, rico en polifenoles, puede impedir y prevenir que la proteína β - amiloide ($A\beta$) forme una especie de grumos en el cerebro, evitando el impulso sináptico y el deterioro cognitivo. Empleando el cacao como unos de los suplementos dietéticos, los cuales podrían utilizarse para prevenir la enfermedad de Alzheimer.⁸⁶

En el 2014, Zapata, S., y colaboradores, evaluaron el efecto del tostado del cacao sobre el contenido de metabolitos secundarios como fenoles totales, taninos condensados, antocianinas totales, catequina, epicatequina, teobromina y cafeína; adicionalmente evaluaron la actividad antioxidante por medio de ABTS^{•+} y ORAC; de cinco clones de cacao cultivados en Colombia. La actividad atrapadora del radical ABTS^{•+} arrojó valores de 384,36 y 686,29 $\mu\text{mol Tx g}^{-1}$ en los granos sin

tratar, y 225,40 y 802,58 $\mu\text{mol Tx g}^{-1}$ en los granos tostados, donde la mayor variación se presentó para los clones ICS 60 y TSH 565.⁸⁷

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 ASPECTOS GENERALES

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Facultad de Química Ambiental, la Universidad Santo Tomás Seccional Bucaramanga, campus Floridablanca.

5.1.1 Disolventes y reactivos.

Los reactivos empleados fueron: Etanol comercial (Merck) 96%, Acetona (Merck), Agua desionizada, Ácido gálico (Carlo Erba), Carbonato de sodio (Merck), reactivo de Folin-Cilocalteu (Panreac), Quercetina (MP Biomedicals), Cloruro de aluminio (Merck), Acetato de potasio (Merck), Dimetilsulfoxido (Merck), Cloruro de sodio (Carlo Erba).

5.1.2 Equipos e instrumentos.

Los equipos e instrumentos que se emplearon en el desarrollo de la investigación fueron: balanza analítica (*Pioneer TM OHAUS*), licuadora de dieciséis (16) velocidades (*Oster*), baño ultrasonido (*Ultrasonik TM 57H*), cabina de extracción de gases y humos (*Multiingeniería Ltda.*), manta de calentamiento (*TechnoKartell*), rota evaporador acoplado a una bomba de vacío (*IKA-RV1G Control*), Espectrofotómetro UV-Vis (*Agilent 8453*), horno (*Thermo scientific*), Lector de microplacas (*Biochrom EZ Read 400*).

5.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En el desarrollo del presente trabajo de grado se efectuaron las siguientes etapas experimentales que se describen a continuación y de manera resumida pueden apreciarse en el esquema 3.

5.2.1 Recolección y preparación de las muestras vegetales.

Como materia prima, se emplearon diferentes frutos de cacao (*Theobroma cacao L*) denominado por especie forastero *clon: FLE 3*, originado en Colombia, suministrados por la finca cacaotera ubicada en Lebrija (Santander). El fruto del cacao fue almacenado a una temperatura de 3°C para posteriores análisis.

Se obtuvieron bayas de cacao, residuos de cacao, específicamente cáscaras de este fruto, como material de partida para el desarrollo de la investigación. (Figura 13).

Figura 13. Fruto de cacao empleado como material de partida



Fuente: Elaborado por autor

El fruto de cacao fue previamente seleccionado, evitando emplear muestras con signos de descomposición. Inicialmente la vaya de cacao fue pelada para extraer la cáscara del fruto, seguidamente la semilla fue despojada del mucilago blanco que la cubre y finalmente la pectina fue cortada en pedazos. (Figura 14).

Figura 14. Extracción manual de las partes del fruto



Fuente: Elaborado por autor

El estado de la muestra, fresco o seco, fue evaluado como variable de extracción en la investigación. Para los ensayos con muestra seca, las cáscaras, semillas y pectinas del cacao fueron deshidratadas en un horno (*GEMMY 888*) a 60°C durante 24 horas.

Una vez secas, las muestras de cáscara, semilla y pectina del cacao fueron trituradas, con la ayuda de una licuadora de dieciséis (16) velocidades (*Oster*), hasta obtener una consistencia homogénea que permita una mayor superficie de contacto durante la extracción (Figura 15) y, se almacenó en bolsas plásticas, en ambiente oscuro para evitar la entrada de aire y radiación, hasta su posterior extracción.

Figura 15. Estado de la muestra seco.



Fuente: Elaborado por autor

5.2.2 Determinación del porcentaje de la humedad relativa del material vegetal.

Para la determinación del porcentaje de humedad relativa de las muestras de (semilla, cáscara, pectina) del cacao se empleó el método gravimétrico (diferencia de peso entre la muestra fresca y seca). De acuerdo con la Ecuación 1.

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{\text{Peso de la muestra húmeda} - \text{Peso muestra Seca}}{\text{Peso muestra húmeda}} * 100\%$$

Para ello se pesaron aproximadamente entre 30-31 g de material vegetal fresco en la balanza analítica (*Pioneer TM OHAUS*) antes de ser llevado al horno para el secado a 60°C hasta obtener una masa constante. Una vez seco, el material vegetal fue llevado a un desecador hasta temperatura ambiente, posteriormente, fue pesado en la balanza analítica con 4 cifras. Este ensayo se realizó por triplicado.

5.2.3 Caracterización del material vegetal.

El material vegetal empleado se sometió a un análisis bromatológico con el fin de dar una caracterización de la composición nutricional de las cáscaras, pectinas y semillas. En el análisis bromatológico se determinaron los siguientes parámetros: humedad, ceniza, grasa, proteína, fibra, carbohidratos totales y valor calórico, reportando los resultados en base húmeda. El análisis bromatológico se llevó a cabo bajo la modalidad de prestación de servicios en el Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

5.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LA CÁSCARA, PECTINA Y SEMILLA DEL FRUTO DE CACAO (*THEOBROMA CACAO L.*)

Los extractos etanólicos de las diferentes partes del fruto de cacao en estado fresco y seco, se obtuvieron con etanol comercial al 96% como disolvente, mediante el método de extracción asistida por ultrasonido (EAU), para lo cual se empleó un baño ultrasonido (*Ultrasonik TM 57H*). La cantidad de muestra empleada en todos los casos fue de 30 g y el tiempo de extracción fue de 4 horas (Ver figura 16).

Figura 16. Extracción asistida por ultrasonido (EAU). Equipo *Ultrasonik TM 57H*, disponible en el Laboratorio de ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás Seccional Bucaramanga.



Fuente: Elaborado por autor

Los extractos crudos se filtraron al vacío a través de papel filtro Whatman N°4, luego se llevaron hasta sequedad empleando un equipo rota evaporador, acoplado a una bomba de vacío (*IKA-RV1G Control*). (Figura 17) Finalmente los extractos obtenidos fueron protegidos de la luz y conservados a 3°C para los posteriores análisis. (Figura 17)

Figura 17. Equipo rota evaporador acoplado a una bomba de vacío *IKA-RV1G Control*, disponible en Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Química Ambiental, USTA-Bucaramanga.



5.4 ENSAYOS DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS: ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE E INHIBICIÓN *IN VITRO* DE ACETILCCOLINESTERASA.

En el presente trabajo se evaluaron las actividades biológicas de actividad antioxidante e inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa, de los extractos etanólicos de las diferentes partes del fruto de cacao en estado fresco y seco.

Para la determinación de la actividad antioxidante se empleó el método de Folin Ciocalteu para hallar la concentración de fenoles totales, el método colorimétrico de AlCl_3 para flavonoides totales y el ensayo de catión radical ABTS^+ , los cuales se describen a continuación.

5.4.1 Determinación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales presentes en los extractos etanólicos de las diferentes partes del fruto de cacao en estado fresco y seco se determinó por el método de Folin Ciocalteu, descritos por Özcan et al., el cual se detalla a continuación.²¹

Preparación de la solución stock de ácido gálico: Se prepararon 100 mL de una solución stock de ácido gálico, empleando una mezcla etanol- agua en una proporción 1:1. Se conservó refrigerada y el tiempo de máximo uso es de dos semanas. También, se preparó una solución de carbonato de sodio al 10% (p/v).

- Preparación de la curva de calibración y de los extractos a estudiar.

En un tubo de ensayo se adicionaron 20 μL del extracto etanólico de la (semilla, cáscara y pectina), seguidamente se añadió una alícuota de 6,5 ml de agua desionizada y 500 μL del reactivo Folin-Ciocalteu. Se agitó y luego se dejó en reposo durante 8 min. Posteriormente se adicionaron 3 mL de Na_2CO_3 al 10% (p/V), se llevaron los tubos de ensayo a un baño de agua a 40°C, durante 30 minutos (con agitación manual periódica. Pasados los 30 minutos se leyó la absorbancia del blanco de reactivos, y de las diferentes soluciones a una absorbancia de 765 nm, en un espectrofotómetro *UV-Vis Agilent 8453* (Ver figura 18). Donde cada solución fue leída en un intervalo de 6 con un período de espera de 30 segundos entre cada lectura. Se usaron soluciones de ácido gálico entre 50 y 500 mg/L (ppm). Para construir la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/g de muestra. Este procedimiento se efectuó con cada una de las muestras de estudio por triplicado. Los valores presentados corresponden a la media \pm desviación estándar (DE).

5.4.2 Determinación de flavonoides totales.

Se realizó por medio del método colorimétrico de AlCl_3 cloruro de aluminio descrito por Chang et al., el cual se detalla a continuación.²⁰

Preparación de la solución stock de Quercetina: Se adicionaron 0.100 g de quercetina en un balón aforado de 100 mL y se aforó con una solución de etanol al 80%. Finalmente se conservó refrigerada hasta su posterior uso. Adicionalmente se preparó una solución de cloruro de aluminio al 10% (p/v). y una solución de acetato de acetato de potasio 1M.

- Preparación de la curva de calibración y los extractos a estudiar.

En un tubo de ensayo se adiciono una alícuota de 500 μL de cada muestra de (semilla, cáscara y pectina), seguidamente se le adicionaron 1,5 mL de etanol al 95%, posteriormente se añadieron 100 μl de AlCl_3 al 10% y 100 μl de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ 1M, se agito la mezcla con ayuda del vortex por 10 segundos, seguido a esto se adicionaron 2,8 ml de agua desionizada. Se conservaron las soluciones durante 30 minutos a temperatura ambiente, pasados los 30 minutos se leyó la absorbancia del blanco de reactivos, y de las diferentes soluciones a una absorbancia de 415 nm, en un espectrofotómetro *UV-Vis Agilent 8453* (ver figura 18). Donde cada solución fue leída en un intervalo de 6 con un período de espera de 30 segundos entre cada lectura. Se usaron soluciones de quercetina entre 5 – 25 $\mu\text{g/mL}$, para construir la curva de calibración. El contenido de flavonoides totales fue calculado como mg equivalentes de quercetina (QE)/g de muestra. Este procedimiento se efectuó con cada una de las muestras de estudio por triplicado. Los valores presentados corresponden a la media \pm desviación estándar (DE)

Figura 18. Espectrofotómetro *UV-Vis Agilent 8453*, empleado para la determinación de polifenoles y flavonoides totales.



Fuente: Elaborado por autor.

5.5 DETERMINACIÓN DE LA ACITIVIDAD ANTIOXIDANTE, MEDIANTE EL ENSAYO DE CATIÓN RADICAL ABTS⁺.²²

Para la realización de este ensayo, se emplearon los siguientes reactivos y equipos instrumentales.

Reactivos:

Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox, 99%) Sigma-Aldrich; α -tocoferol (Vitamina E, 99%) Sigma-Aldrich; Butilhidroxianisol (BHA, 99%) Sigma-Aldrich; Butilhidroxitolueno (BHT, 99%) Merck; Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS, 99%) Sigma-Aldrich; Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico (DTNB); persulfato de potasio (99%) Sigma-Aldrich; sulfato de hierro (98%), cloruro de potasio (99%), cloruro de sodio (99%), (etanol, agua,) grado HPLC.

Equipos instrumentales:

Los ensayos colorimétricos se llevaron a cabo en un lector de microplaca *EZ Read Eliza* de 96 pozos Versamax con software galapagos para adquisición de datos (Figura 19).

Figura 19. Lector de microplacas de utilizado para los ensayos *in vitro* de la actividad antioxidante e inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, disponible en Laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Química Ambiental, USTA-Bucaramanga



Fuente: Elaborado por autor

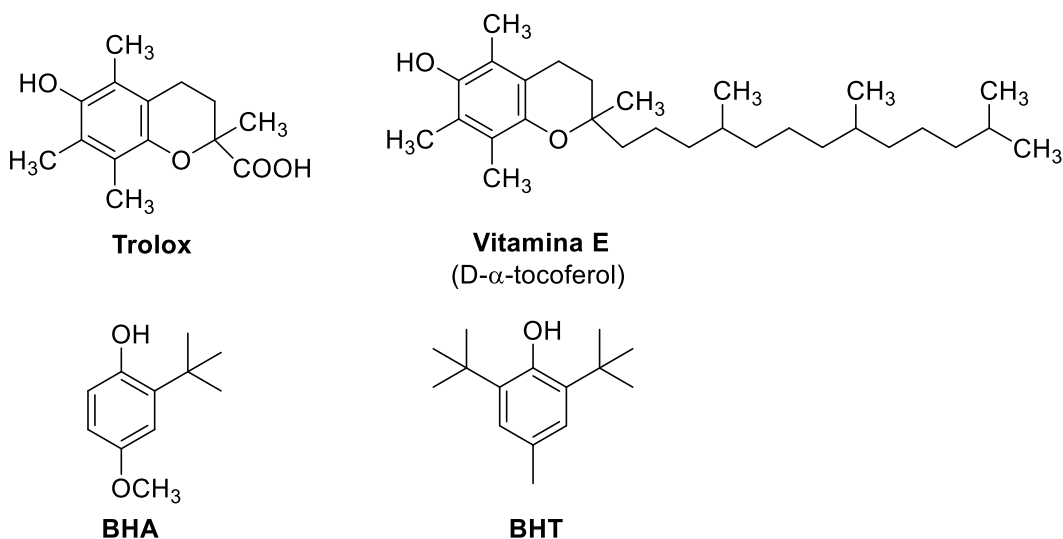
Esta fase del trabajo consistió en una prueba experimental *In vitro* la que se determinó, a través del método propuesto por Re et al,⁸⁸ con las modificaciones propuestas por Muñoz y Col,⁸⁹ y adaptadas a las condiciones de trabajo del laboratorio.

5.5.1 Preparación de soluciones patrón:

- Cation radical ABTS: Se disolvieron 3,31 mg de peroxidisulfato de potasio ($K_2S_2O_8$), y 18,01mg de ABTS disueltos en agua destilada (5mL); la mezcla se dejó reposar durante 16 h a temperatura ambiente, en ausencia de luz. Una alícuota de la solución de $ABTS^{\cdot+}$ se diluyo en etanol, hasta obtener una absorbancia cercana a 0.75 nm.
- Preparación de muestras: Se pesó 1.0 mg de muestra (extracto), se diluyo a 1 mL con etanol. Seguidamente, de la anterior solución se tomaron 250 μ L y se diluyo con 750 μ L de etanol. La concentración de las muestras quedo a (250 ppm).

Como patrón de referencia se utilizó el Trolox®, y como compuestos de referencia un antioxidante natural α -tocoferol (vitamina E), dos antioxidantes sintéticos BHT (Butil-hidroxi-tolueno) y BHA (Butil-hidroxi-anisol), sus respectivas estructuras químicas se observan en la Figura 20.

Figura 20. Estructuras químicas de los antioxidantes naturales y sintéticos

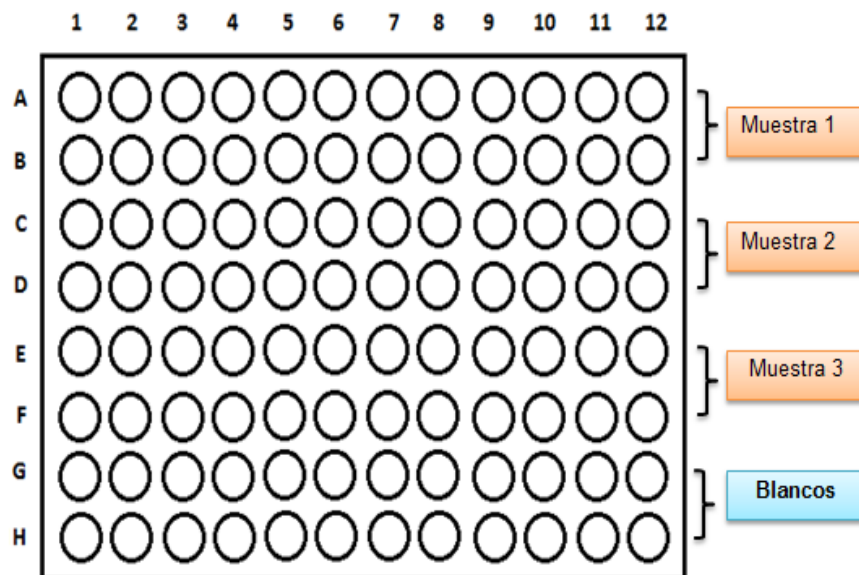


Fuente: Elaborado por autor

Se prepararon soluciones Stock de los compuestos a evaluar en concentraciones de 1×10^{-3} M, para el trolox que es la curva patrón de referencia y para el BHA, BHT y α -tocoferol 160ppm, 200ppm y 420ppm respectivamente, las cuales se diluyeron en forma seriada desde C_1 hasta C_{12} (Ver figura 21), seguidamente se adicionaron 200 μ l de la solución del cation radical $ABTS^{\cdot+}$, finalmente se dejó incubar por 30 minutos y la microplaca fue leída por un lector de microplacas, a una longitud de onda de λ 734 nm. Se realizó el mismo procedimiento para los extractos naturales (250 ppm).

El porcentaje de inhibición de la absorbancia se calculó, y se graficó, como una función de la muestra problema, con los datos de la sustancia de referencia (Trolox®). Para cada sustancia se determinó la capacidad antioxidante equivalente al Trolox. Cada uno de estos ensayos se realizó por triplicado.

Figura 21. Diseño de una microplaca de 96 pocillos para la determinación de la actividad Antioxidante.



Fuente: Elaborado por autor

De acuerdo con las absorbancias obtenidas, se determinó el porcentaje de actividad antioxidante con la ecuación que se presenta a continuación.

$$Inh. ABTS_{734} (\%) = \left(\frac{A_B - A_M}{A_B} \right) \times 100 \quad (Ecuación 2)$$

Dónde:

A_B = Promedio de la absorbancia de todos los blancos

A_M = Absorbancia transcurridos 30 minutos de la adición del ABTS a la muestra.

5.6 DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA INHIBICIÓN DE LA ENZIMA ACETILCOLINAESTERASA (AChE).²³

Materiales y reactivos

Fosfato monosódico (NaH_2PO_4 , 98%) Alfa Aesar; Hidrógeno fosfato de potasio (K_2HPO_4 , 98%) Panreac; Tween 20, Merck; Yoduro de acetiltiocolina (98) Sigma-Aldrich; Acetilcolinesterasa del pez *Electrophorus electricus*, Sigma-Aldrich; Galantamina hidrobromuro, Alfa Aesar; Dimetilsulfoxido (99%) Merck; todos los solventes (etanol, agua), fueron grado HPLC.

5.6.1 Preparación de soluciones patrón.

- PBS: Tampón fosfato salino pH: 7.5
- Solución enzimática: Disolver 12,5 μl de enzima con PBS en un balón aforado de 25 mL
- Solución sustrato pH 7.5: Se pesaron 56,76 mg de Na_2HPO_4 , 7,8 mg de DTNB (dimetilnitrobenzoato) y 6,9 mg de Yoduro de acetilcolina, se disolvieron en un balón de 100 mL aforado con agua destilada. Se midió su pH igual a 7.5.
- Preparación de muestras: Se preparó una solución de extracto de 2000 ppm con DMSO (dimetilsulfoxido).

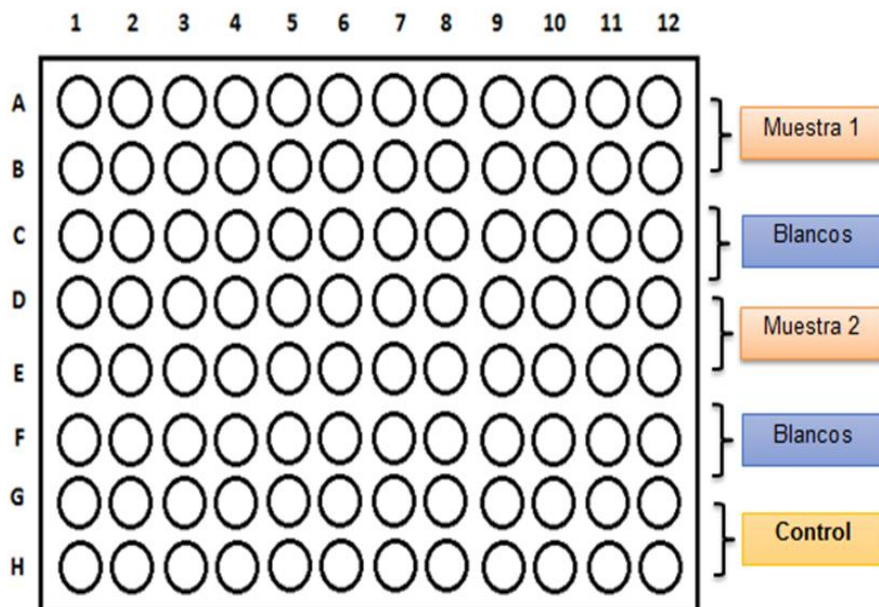
Para la determinación de la actividad inhibitoria de la AChE, se empleó como sustancia de referencia la galantamina. Los extractos se analizaron mediante el método descrito por Ellman *et al*, usando la AChE aislada del pez *Electrophorus electricus*, mediante espectroscopía VIS a 412nm.²³

Las muestras a evaluar, se prepararon de la siguiente manera:

Se colocaron 50 μl de una solución del compuesto a probar en concentraciones seriadas (desde 1×10^{-3} M, para compuestos puros y de 2000 ppm para los extractos naturales), disueltos en buffer fosfato salino de pH 7.5 y se adicionaron 50 μl de la AChE. La placa se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y se adicionaron 100 μL de la solución sustrato de pH 7.5, compuesta por el ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico y yoduro de acetiltiocolina. Pasados los cinco minutos, se leyó la absorbancia a 412 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

La microplaca es 96 pozos (matriz de 8 x12), este procedimiento se realizó por duplicado para dos muestras, en cada placa con diluciones seriadas desde la concentración C1 hasta la C12. Se incluyó un blanco para cada muestra y para cada concentración, y dos filas de control para determinar el 100 % de actividad enzimática. (Figura 22)

Figura 22. Microplaca de 96 pocillos empleada para la determinación de la inhibición *in vitro* de la acetilcolinesterasa.



Fuente: Elaborado por autor

* C1-C12: concentraciones;

Control: necesario para determinar la actividad de la enzima sin ningún tipo de inhibidor;

Blanco: necesario para restar cualquier absorción causada por los reactivos.

Los cálculos de las IC_{50} y las gráficas se realizaron a partir de las curvas obtenidas de graficar la concentración Vs el % de inhibición. La IC_{50} se define como la concentración requerida para conseguir el 50% del efecto inhibitorio máximo.

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición de acuerdo con la ecuación 3.

$$\% I = 100 - \frac{Muestra-Blanco}{Promedio Control-Blanco} * 100 \% \quad (Ecuación 3)$$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para caracterizar el valor nutricional del fruto del cacao en estado fresco, se realizó un análisis bromatológico. Las muestras fueron analizadas en el Laboratorio de Alimentos del CICTA de la UIS. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. El informe completo, con la descripción del análisis bromatológico realizado a la semilla, cáscaras y pectina del fruto de cacao se presenta en el Anexo A.

Tabla 2. Resultados del análisis bromatológico correspondiente a la caracterización inicial de la (semilla, cáscara y pectina) del fruto del cacao.

PARÁMETRO EVALUADO	SEMILLA (g/100 g de muestra)	CÁSCARA (g/100 g de muestra)	PECTINA (g/100 g de muestra)	MÉTODO DE ANÁLISIS
Humedad	31,61	77,77	87,92	AOAC 931.04 18th Edición-Gravimétrico
Ceniza	2,44	1,94	1,35	AOAC 972.15 18th Edición-Gravimétrico
Grasa	40,13	n.d*	n.d*	AOAC 963.15 Ed. 18:2005-Gravimétrico
Proteína	9,25	1,29	0,59	AOAC 970.22 Ed. 18:2005-Kjeldahl
Fibra	3,58	3,67	2,61	AOAC 930.20 18th Edición
Carbohidratos totales	16,57	18,9	10,10	-
Valor calórico	464,45	81,56	43,12	-

*n.d: no detecta

En el análisis bromatológico se reporta una alta humedad relativa para cada parte del fruto de cacao, siendo la pectina el componente con mayor contenido de agua dentro del mismo. Promediando los resultados de la humedad de semilla, cáscara y pectina se puede decir que aproximadamente el 65,76 % del fruto es agua, esto implica que en la formación y maduración del fruto el árbol requiere grandes cantidades de agua. Los resultados de cenizas en la muestra de semilla son

mayores a los de cáscara y pectina debido a que, la mayoría de nutrientes se encuentran en la semilla del fruto, y estos (sales) se expresan en ceniza.

Los principales componentes de la semilla del cacao son las grasas (40,13 g/100 g muestra) y proteínas, expresando así la cantidad de nutrientes (fósforo, nitrógeno, magnesio) presentes en las muestras. La cáscara también presenta una significativa fuente de proteínas. Respecto al contenido de fibra, se puede decir que el fruto de cacao posee alto contenido de la misma (2,61-3,67 g/100 g), estando presente en todo el fruto del cacao, incluyendo el mucilago. El valor energético de este fruto es muy alto. La cáscara, semilla y pectina del cacao aportan de 10-16 carbohidratos totales por cada 100 gramos, y según su composición, aportan entre 464 -500 calorías.

6.2 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD RELATIVA DEL FRUTO DE CACAO

Se empleó el método gravimétrico para determinar el porcentaje (%) de humedad. Este procedimiento se realizó, por triplicado, teniendo en cuenta cortar el material vegetal previo al secado, en pedazos pequeños con el fin de aumentar el área de contacto.

En la Tabla 3, se presentan los resultados de la determinación de la humedad relativa de las muestras de (semilla, cáscara y pectina) del fruto de cacao, la cual se realizó en el laboratorio de ciencias básicas de la USTA Bucaramanga. En el anexo B se encuentran sus respectivos triplicados.

Tabla 3. Resultados % de humedad relativa para la semilla, cascara y pectina.

MUESTRA	PESO MUESTRA FRESCA (g)	PESO MUESTRA SECA (g)	% HUMEDAD
Semilla	31,7206	21,4020	33
Cáscara	30,6412	7,5086	76
Pectina	32,0995	3,6427	89

El porcentaje (%) de humedad relativa obtenido para la semilla, cáscara y pectina del cacao por el método gravimétrico fue de 33%, 76%, 89%, respectivamente.

En la tabla 3 se observan los valores de humedad determinados en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la USTA y en la tabla 2 los que se hallaron en el Laboratorio de Alimentos del CICTA de la UIS. Como se pudo observar, la comparación de los resultados del % de humedad relativa en las muestras de semilla, cáscara y pectina varía un poco, lo que puede deberse a los factores

ambientales de los laboratorios y al cambio sistemático de equipos, puesto que, la diferencia de % humedad en las tres muestras no supera el 2 %.

6.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DEL FRUTO DE CACAO

Para la obtención de los extractos del fruto de *Theobroma cacao L*, especie forastero, se empleó el método de extracción asistida por ultrasonido (EAU), como solvente se utilizó etanol comercial al 96%, de acuerdo con las condiciones descritas en la sección 5.3. Se evaluó también el estado del material vegetal, empleando las muestras en estado fresco y seco, para determinar la variación de la composición química de los extractos.

Los extractos de semilla presentaron tonalidades violetas, mientras que los de cáscara y pectina presentaron tonalidades naranjas, siendo los colores más intensos y oscuros para los extractos obtenidos de las muestras secas. De igual forma, el aspecto o consistencia para la semilla fue diferente, este tuvo apariencia perlada, la cáscara y pectina fue viscosa para todos sus extractos etanólicos.

Tabla 4. Porcentaje (%) de rendimiento de extracción de los extractos obtenidos.

Parte del fruto	Estado de la muestra	Peso promedio de la muestra (g)	Peso promedio del extracto (g)	Rendimiento Extracción (%)
Semilla	F*	30,0129	1,6927	4,92
	S**	30,4448	1,6550	5,42
Cáscara	F	30,7231	1,4670	4,78
	S	30,1678	1,8509	6,14
Pectina	F	30,4751	1,2428	4,07
	S	30,3562	1,6962	5,59

*F: fresco; S** : seco

Con esto se demuestra que por cada 30 gramos de semilla, cáscara y pectina en estado fresco y seco se puede extraer aproximadamente entre 1 y 1,8 g de extracto con un rendimiento del 4 al 6%.

En la Tabla 4 se puede observar que la parte del fruto que arrojó mayores rendimientos en la extracción de cacao fue la cáscara en estado seco con 6,14% de rendimiento promedio, seguido por la pectina en estado seco con 5,59% y semilla en estado seco con 5,42%. Determinándose que el rendimiento es mayor para las muestras en estado seco. Los resultados se analizaron por triplicado, en el Anexo C se encuentran sus respectivos valores.

6.4 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES Y FLAVONOIDES TOTALES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL FRUTO DEL CACAO.

6.4.1 Determinación de polifenoles Totales

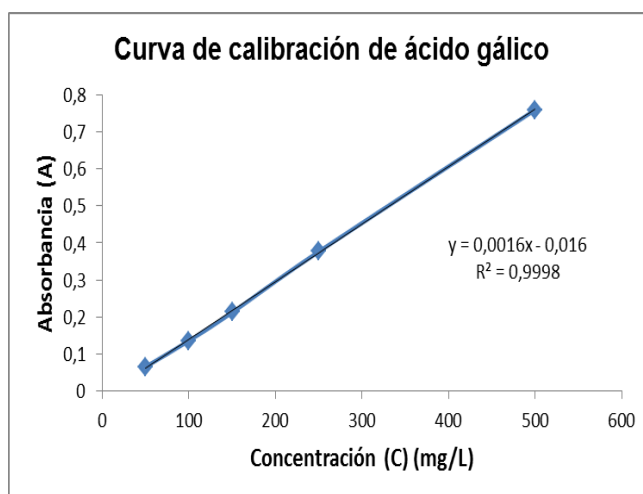
En la Tabla 5 se muestran las absorbancias correspondientes a cada patrón de ácido gálico empleado para la obtención de la curva de calibración necesaria para la determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Tabla 5. Absorbancias de la curva de calibración de ácido gálico (AG) para la determinación de polifenoles totales en extractos de cacao.

Concentración AG mg/L	Absorbancia a 765 nm.
50	0,0658± 0,0010
100	0,1357± 0,0003
150	0,2126± 0,0008
250	0,3767± 0,0007
500	0,7600± 0,0013

Con el fin de expresar los resultados como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/mg), se construyó una curva de calibración en intervalos de concentración entre 50-500 mg/L, todas las determinaciones se realizaron por sextuplicado. (Ver anexo D) En la figura 23 se presenta la curva de calibración que se adecúa a la ecuación de una recta.

Figura 23. Curva de calibración de Ácido Gálico. Absorbancia vs concentración (mg/L).



Para la determinación de polifenoles totales (PT), se obtuvo la curva de calibración para el ácido gálico ($R^2 = 0.998$). Dando así un factor de correlación cercano a 1, lo que quiere decir que aumenta la confiabilidad de estos resultados

La Tabla 6 resume los resultados de la determinación de polifenoles totales (PT) presentes en los extractos etanólicos del fruto del *Theobroma cacao L* en estado fresco y seco. En el Anexo E se evidencian los respectivos cálculos para complementar siguiente tabla.

Tabla 6. Determinación de polifenoles totales en estado fresco y seco

Muestra	Absorbancia 765 nm	Peso extracto seco PT (mg)	mg de AG/ L extracto	mg de AG/ g extracto seco
S-F	0,7058±0,0009	4,3	200481,8	75,7
C-F	0,5128±0,0004	4,9	165571,1	39,7
P-F	0,1691±0,0009	13,3	57950,7	6,1
S-S	0,3933±0,0004	3,9	128166,4	42,8
C-S	0,1783±0,0014	4,6	60839,0	16,6
P-S	0,1444±0,0007	14,3	50232,0	5,9

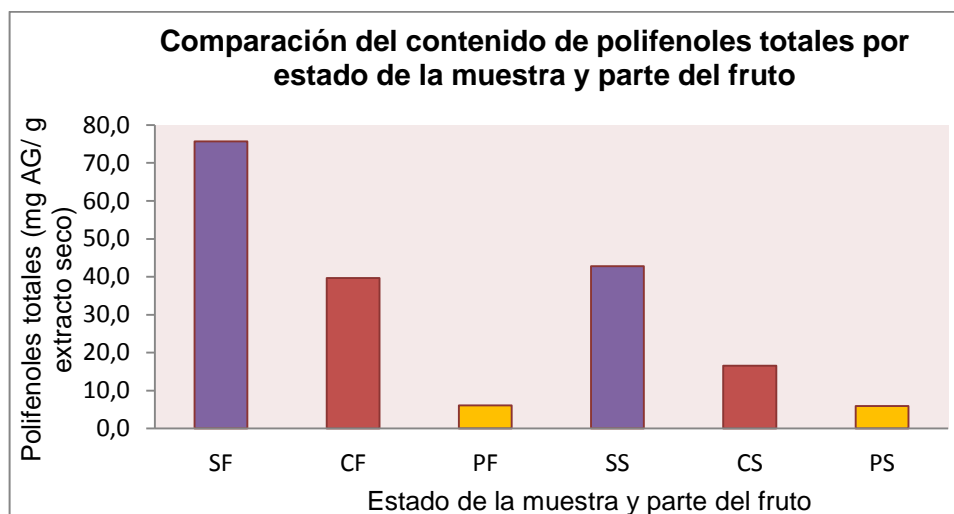
Nota: Cada valor representa la media de 6 repeticiones ± la desviación estándar. Abs: absorbancia; PT: polifenoles totales; AG: ácido gálico S-F: semilla fresca; C-F: cáscara fresca; P-F: pectina fresca; S-S: semilla seca; C-S: cáscara seca; P-S: pectina seca.

En general, los extractos analizados poseen un contenido significativo de compuestos fenólicos. Como se puede observar en la tabla 6, la muestra de semilla fresca del cacao es la parte del fruto en la que se presenta la mayor concentración de polifenoles (75,7 mg AG/g extracto seco), seguido de la muestra de semilla seca con (42,8 mg AG/g extracto seco) y cáscara fresca (39,7 mg AG/g muestra). Los valores obtenidos experimentalmente se encuentran en un rango superior e igual al reportado en la literatura el cual se encuentra cerca de (36,5-39 mg ÁG/g extracto seco), para las muestras de semilla seca.^{90,91} Cabe resaltar que el contenido total de fenoles encontrado en el presente trabajo para extractos de cáscara de cacao es significativamente mayor que el reportado en la literatura para las hojas del árbol de cacao con un valor de 1.9 mg / g extracto seco, de igual forma el contenido de las muestras de pectina también los supera.⁹²

Camino, reporto en el 2014 que el contenido de polifenoles totales obtenido varía entre 33.55 a 62.89 mg AG/g extracto en semillas de cacao desengrasada, también estableció que el contenido de estos compuestos en la semilla seca de cacao varía entre 50 mg de AG/g extracto para cacaos forasteros, 30mg AG/g muestra para cacaos criollos. Estos resultados se asemejen a los reportados experimentalmente.

Por otra parte, los valores de polifenoles obtenidos experimentalmente en las muestras de semilla fueron superiores a los reportados para diferentes marcas de chocolates negros de los Estados Unidos (12,30-14,88 mgÁG/g muestra).

Figura 24. Comparación del contenido de polifenoles totales de extractos de las diferentes partes del fruto de cacao en estado fresco y seco.



*SF: semilla fresca; CF: cáscara fresca; PF: pectina fresca; SS: semilla seca; CS: cáscara sea; PS: pectina seca.

En la Figura 24 se muestra la comparación del contenido de polifenoles totales presentes en los extractos etanólicos de semillas, cáscaras y pectinas, del fruto del cacao tanto estado fresco y seco. Como se observa en la figura las muestras de semilla son las que mayor concentración de polifenoles tienen seguidas de las muestras de cáscara y finalmente las muestras de pectina que presentan muy bajas concentraciones. El contenido de polifenoles totales se observa con mayor concentración en las muestras de estado fresco.

6.4.2 Determinación de Flavonoides Totales

En la Tabla 7 se muestran las absorbancias correspondientes para la obtención de la curva de calibración necesaria para la determinación de flavonoides totales por el método colorimétrico de $AlCl_3$

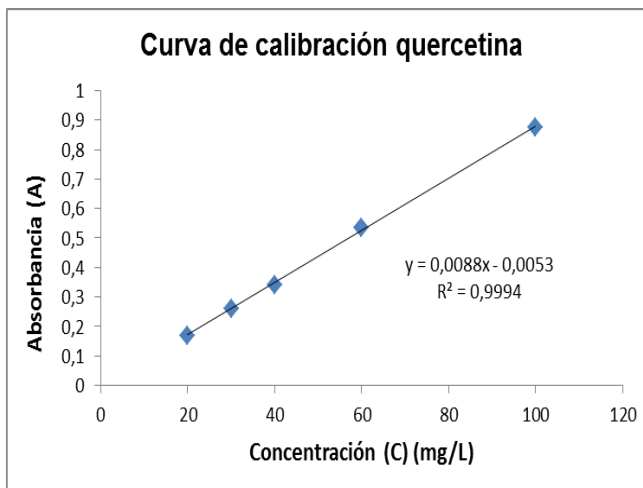
Tabla 7. Datos de absorbancias de la curva de calibración de quercetina para la determinación de flavonoides totales en extractos de *Theobroma cacao*.

Concentración Quercetina mg/L	Absorbancia a 415 nm
20	0,1687± 0,00096
30	0,2610± 0,00102
40	0,3424± 0,00082
60	0,5356± 0,00121
100	0,8735± 0,00160

El contenido de flavonoides totales fue calculado como equivalentes de quercetina (mg de quercetina/mg de muestra). La curva de calibración se trabajó en un

intervalo de concentración de 20-100 mg/L, todas las determinaciones se realizaron por sextuplicado en el (Anexo D) se encuentran sus respectivas repeticiones. En la figura 25 se presenta la curva de calibración y el coeficiente de correlación ($R^2=0.9903$) indica una relación lineal entre las dos variables trabajadas. Los resultados se expresaron como el promedio de las determinaciones \pm desviación estándar.

Figura 25. Curva de calibración de Quercetina. Absorbancia vs concentración.



La Tabla 8 resume los resultados de la determinación de flavonoides totales, en los extractos etanólicos del fruto de *Theobroma cacao L* en estado fresco y seco. En el Anexo H se evidencian los respectivos cálculos para complementar la siguiente tabla.

Tabla 8. Determinación de flavonoides totales en estado fresco y seco.

Extracto	Absorbancia 415 nm	Peso extracto seco FT (mg)	FT (mg quercetina / L extracto)	FT(mg quercetina/ g extracto seco)
S-F	0,3156 \pm 0,0016	5,2	400,8	0,15
C-F	0,4343 \pm 0,0010	8,6	499,5	0,07
P-F	0,4241 \pm 0,0017	50,1	487,9	0,01
S-S	0,5763 \pm 0,0007	5,0	752,3	0,25
C-S	0,5374 \pm 0,0011	8,2	616,7	0,11
P-S	0,3166 \pm 0,0018	31,8	493,4	0,04

Nota: *Cada valor representa la media de 6 repeticiones \pm la desviación estándar. Abs: absorbancia; FT: flavonoides totales; S-F: semilla fresca; C-F: cáscara fresca; P-F: pectina fresca; S-S: semilla seca; C-S: cáscara seca; P-S: pectina seca.

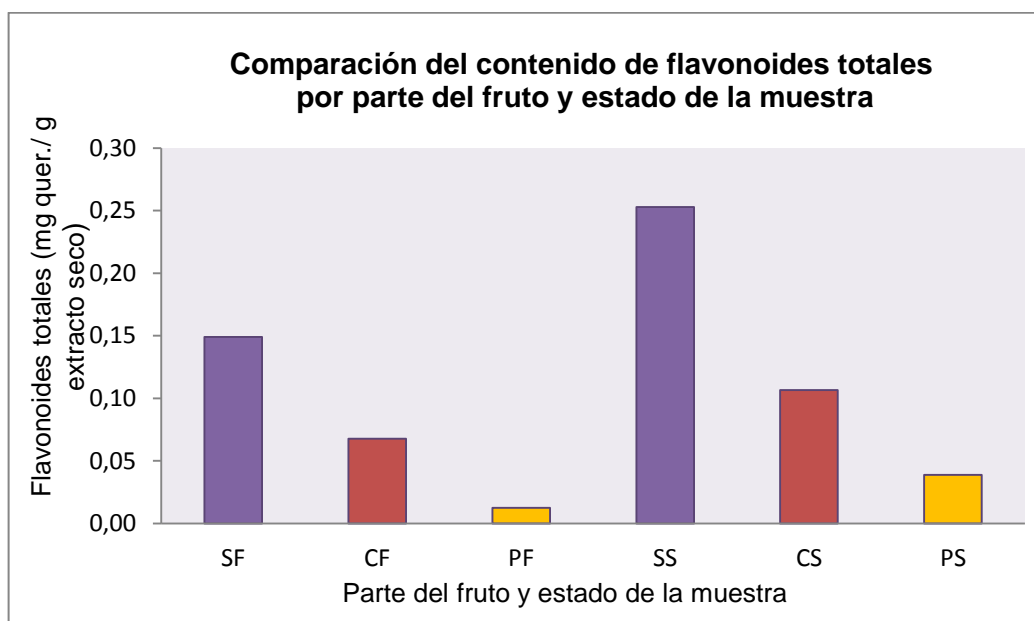
La concentración de flavonoides totales (ver tabla 8) fue mayor en la muestra de semilla seca con (0,20 mg quercetina /g extracto seco), seguido de la semilla fresca (0,15 mg quercetina/g extracto seco) y cáscara seca (0,11 mg quercetina/g extracto seco).

En la muestra de cáscara fresca y seca se presenta también una concentración importante de flavonoides, por lo que se puede considerar su aprovechamiento para la obtención de dichos compuestos de interés en las diversas industrias. Es de gran interés darle un seguimiento especial a los residuos de la cáscara de cacao por su gran contenido de compuestos fenólicos. Debido que si se compara el contenido de polifenoles totales (PT) y flavonoides totales (FT) de la cáscara con el de la semilla, es muy cercano.

Por su parte, los resultados de la determinación del contenido de flavonoides totales muestran valores menores que los obtenidos para el análisis de polifenoles totales. Esto se encuentra dentro de lo esperado, siendo que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos presentes en el fruto del cacao.

Por otra parte, el contenido de polifenoles y flavonoides totales en las muestras secas de pectina era mayor, que en las muestras frescas, sin embargo su concentración respecto al de la semilla es notoriamente baja.

Figura 26. Comparación del contenido de flavonoides totales de extractos de muestras frescas y secas obtenidos de la semilla, cáscara y pectina del cacao.



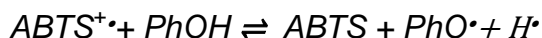
*SF: semilla fresca; CF: cáscara fresca; PF: pectina fresca; SS: semilla seca; CS: cáscara sea; PS: pectina seca.

En la figura 26 se muestra una comparación del contenido de flavonoides totales de extractos etanólicos de semillas, cáscaras y pectinas de cacao, tanto fresca como seca. El extracto con mayor contenido de flavonoides fue la semilla en estado seco, la comparación del contenido de flavonoides en las diferentes partes del cacao, son de mayor concentración las muestras en estado seco.

6.5 Determinación de la actividad antioxidante

La actividad biológica de interés se determinó mediante la disminución del color azul-verdoso del catión radical $ABTS^{+\cdot}$, cuando reacciona con el compuesto con posible actividad antioxidante y se produce el ABTS neutro incoloro y como se observa en la (Figura 27)

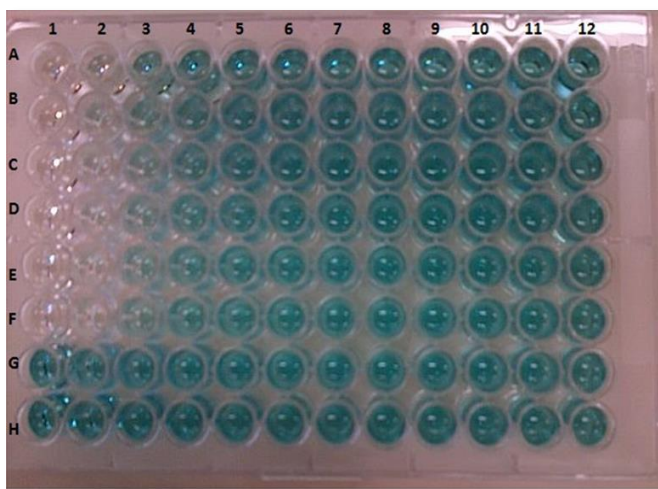
Reacción del catión-radical $ABTS^{+\cdot}$ con el posible antioxidante.



El $ABTS^{+\cdot}$ es soluble en solventes acuosos y orgánicos, lo cual lo hace un método apto para determinar la capacidad antioxidante hidrofílica y lipofílica de extractos y fluidos biológico.⁹³

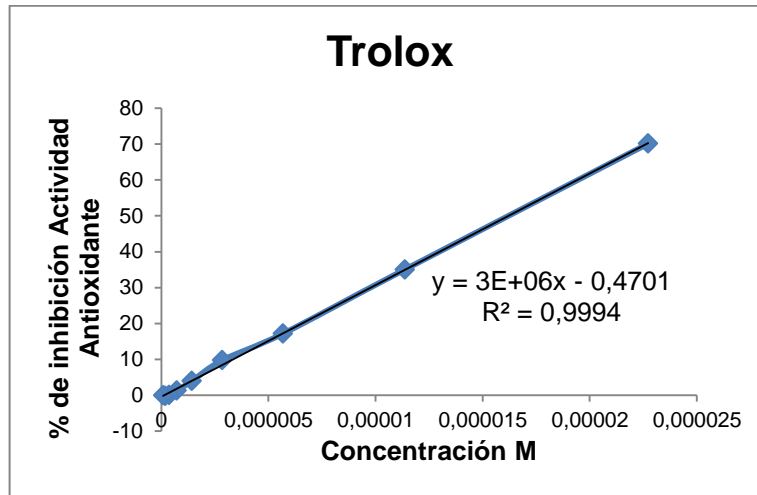
En el presente bioensayo se determinó el valor TAA para antioxidantes naturales como la vitamina E, y sintéticos como el BHT y el BHA. Como también para las muestras de los extractos naturales. El Trolox fue empleado como compuesto de referencia.

Figura 27. Microplaca de lectura con tres muestras (Vitamina E, BHT y BHA) por duplicado y dos filas de blancos.



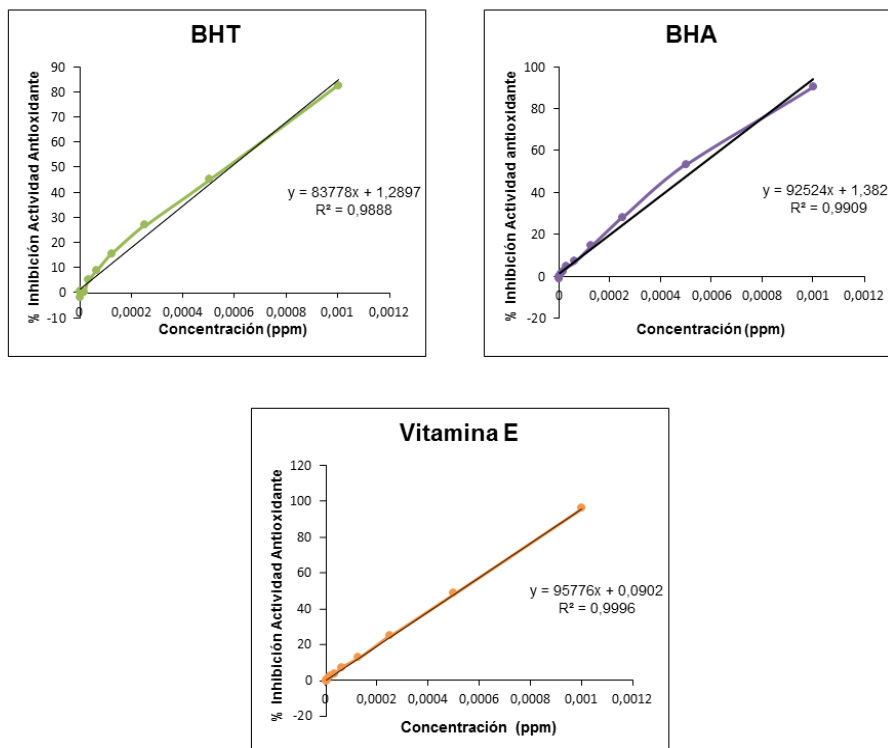
El trolox fue la primera muestra a la que se le determinó la actividad antioxidante, puesto que su valor es necesario para calcular los valores TAA de los antioxidantes comerciales y de los extractos del cacao. A continuación se muestra la mejor grafica obtenida de Trolox (figura 28).

Figura 28. Curva de Trolox, % de inhibición vs concentración, con absorbancias medidas a los 30 min.



Después de calcular la pendiente de trolox, se realizó el mismo procedimiento para calcular la concentración del BHT, BHA y la Vitamina E. como (%) de inhibición vs concentración (ppm). Las cuales se encuentran en la figura 29.

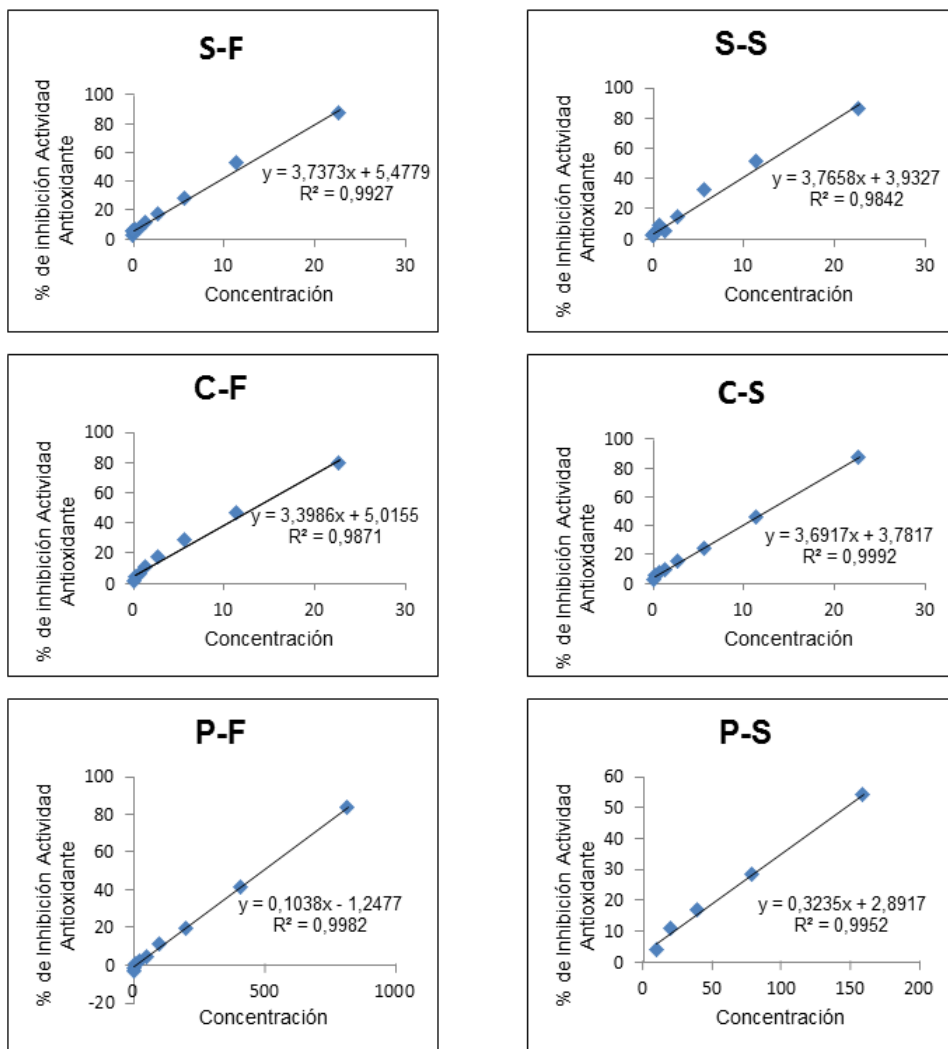
Figura 29. Curvas de la inhibición del ABTS por la Vitamina E, el BHA y el BHT como (%) de inhibición vs concentración.



Con los valores de las pendientes de cada sustancia y del Trolox (figura 28) se calculó el valor de TAA. En la Tabla 9 se recogen los resultados obtenidos.

A continuación se analizaron las muestras de los extractos etanólicos de Semilla, Cáscara y pectina en sus dos estados fresco y seco. Los resultados de las gráficas se muestran en la figura 31 y sus respectivos valores TAA se recogen en la tabla 9.

Figura 30. Gráficas de la inhibición del ABTS por los extractos etanólicos de la (semilla, cáscara y pectina del cacao), como (% de inhibición vs concentración (ppm)).



S-F: semilla fresca; S-S: semilla seca; C-F: cáscara fresca; C-S: cáscara seca; P-F: pectina fresca; P-S: pectina seca.

Para determinar el valor de la **Actividad Antioxidante Total (TAA)** de los extractos etanólicos del cacao (*Theobroma cacao L*), se usó la ecuación 3, la cual corresponde a la relación entre la pendiente obtenida de la curva de trolox sobre Kg de sustancia evaluada. Los resultados se condensan en la tabla 9.

Ecuación para determinar el valor TAA de extractos naturales.

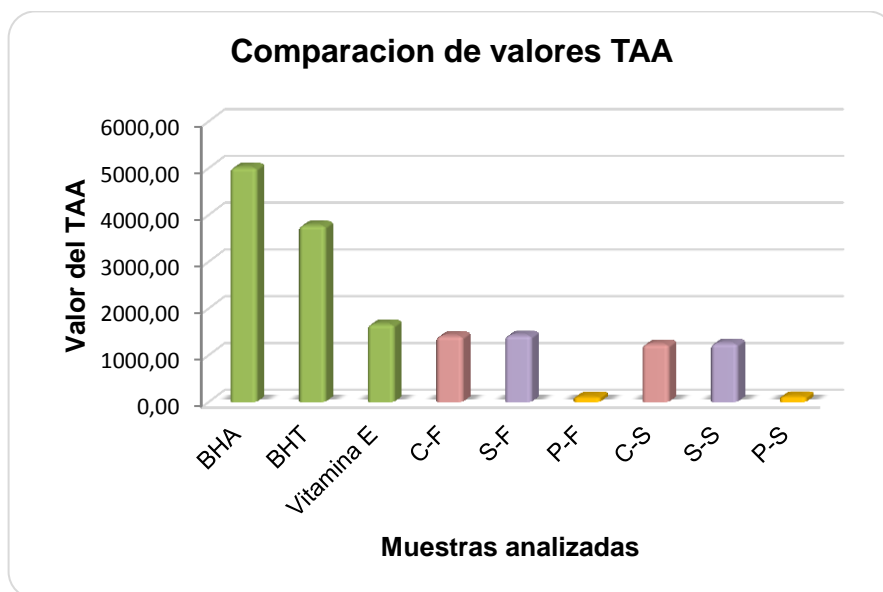
$$TAA = \frac{\text{mmol Trolox}}{\text{Kg sustancia evaluada}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Tabla 9. Resultados de actividad antioxidante, mediante en ensayo de coloración del radical ABTS⁺.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)	TAA (mmol Trolox/Kg) Muestras	SD	CV
Vitamina E	420	1663,36	4,29E-07	4,26
BHA	160	5016,18	1,46E-07	4,37
BHT	200	3777,24	8,71E-08	1,96
C-F	250	1412,69	37,70	2,61
S-F	250	1426,73	42,65	2,95
P-F	7000	106,03	1,89	3,05
C-S	250	1237,18	37,51	2,95
S-S	250	1255,30	25,82	2,19
P-S	5000	116,27	3,54	3,34

*SD: desviación estándar; *CV: coeficiente de variación S-F: semilla fresca; C-F: cáscara fresca; P-F: pectina fresca; S-S: semilla seca; C-S: cáscara seca; P-S: pectina seca.

Figura 31. Comparación de los valores TAA de las muestras y los antioxidantes de referencia.



Como se observa en la tabla 9, la reactividad de los extractos de cáscara, pectina y semillas de cacao, hacia el catión radical $ABTS^+$, mostraron valores de TAA (mmol de Trolox/Kg extracto) entre $116,27 \pm 3,54$ y $1426,73 \pm 42,65$, demostrando mayores capacidades antioxidantes en los extractos de semilla fresca y cáscara fresca. Sin embargo, los seis extractos evaluados demostraron inhibición de la coloración del reactivo. Los extractos de menor actividad fueron los de pectina fresca y pectina seca.

Al comparar los cuatro extractos se encontró que sus actividades antioxidantes decrecen así: Semilla fresca >> Cáscara fresca > Semilla seca > Cáscara seca (Figura 31). La capacidad para atrapar el catión-radical $ABTS^+$. Por los extractos de pectina fresca y seca, determinados por este método, se reportan por primera vez.

Los extractos etanólicos evaluados presentaron menor capacidad antioxidante que las sustancias de referencia, BHA, BHT. Sin embargo, las muestras de cáscara y semilla en estado fresco y seco, mostraron capacidad antiradicalaria mayor a la de la Vitamina E (1663,36 mmol de Trolox/Kg extracto), la cual corresponde a una concentración de 420 ppm, siendo esta mayor que la de mis extractos naturales con 250 ppm, por tanto las muestras de semilla y cáscara son mayores que el antioxidante natural vitamina E. Ver tabla 9.

Los valores obtenidos experimentalmente en la actividad antioxidante de la semilla seca del cacao se encuentran en un rango inferior al reportado en la literatura, el cual, se encuentra cerca de (22930 mmol de trolox/Kg muestra), para las muestras de semilla y para las muestras de chocolate amargo se reporta una actividad de 270110 mmol Trolox/Kg muestra, cabe resaltar que la diferencia de resultados puede estar implicada en el tratamiento de las muestras de cacao.⁹¹

Por otro lado, la capacidad antioxidante de los extractos del cacao se debe a la presencia de flavonoides y otro tipo de compuestos fenólicos, sin embargo, esta elevada capacidad antioxidante es significativa para la salud porque puede prevenir enfermedades como el cáncer y otras enfermedades degenerativas.

El aumento de la actividad antioxidante en los diferentes extractos, coincide con el contenido de fenoles totales, mostrando una posible correlación entre estos metabolitos y la actividad antioxidante en el fruto del cacao. Concluyendo en numerosos estudios que el contenido fenólico puede contribuir significativamente a su capacidad antioxidante.

Como se observa en la tabla 9, el coeficiente de variación es menor a 4, lo cual me indica que los resultados no se encuentran tan dispersos respecto al promedio.

A continuación se hizo una relación entre la cantidad de compuestos fenólicos presentes en las muestras de cacao frente a la actividad antioxidante presente en los extractos de semilla, cáscara y pectina. (Ver tabla 10)

Tabla 10. Relación de los compuestos fenólicos frente a la actividad antioxidante.

Muestra	Peso extracto seco antioxidante (mg)	Peso extracto seco PT (mg)	PT (mg AG/ g extracto seco)	Peso extracto seco FT	FT (mg quercetina/ g extracto seco)	Relación PT con AO (mg AG/ g extracto seco)	Relación FT en AO (mg quercetina/ g extracto seco)
SF	1	4,3	75,72	5,2	0,15	17,5	2,85E-02
CF	1	4,9	39,65	8,6	0,07	8,0	7,89E-03
PF	10	13,3	6,07	50,1	0,01	0,5	2,48E-04
SS	1	3,9	42,82	5,0	0,20	11,0	3,97E-02
CS	1	4,6	16,55	8,2	0,11	3,6	1,30E-02
PS	6	14,3	5,94	31,8	0,04	0,4	1,23E-03

AO: actividad antioxidante; PT: polifenoles totales; AG: ácido gálico.

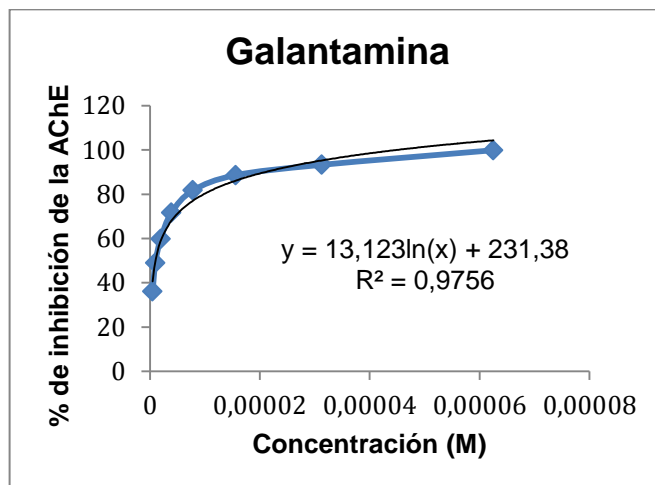
Como se observa la tabla 10, la relación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante es directamente proporcional puesto que a mayor concentración de polifenoles mayor capacidad antioxidante de la muestra (ver tabla 9). Por lo cual dicha actividad puede ser atribuida a la presencia de este grupo de compuestos presentes en los extractos etanólicos.

6.6 Determinación de la inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa.

El método que se usó en esta investigación para determinar la inhibición de la AChE, fue el propuesto por Ellman. En este procedimiento la actividad enzimática fue medida fotométricamente, a 412 nm.

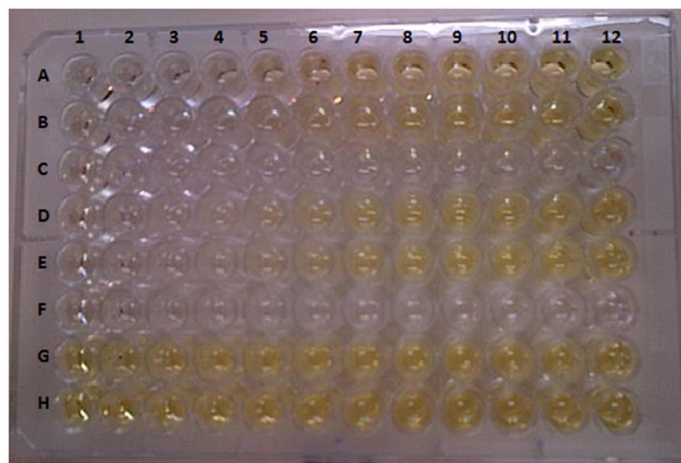
En el presente bioensayo se determinó el % de inhibición para todas las muestras de cacao (cáscara, pectina y semilla) en estado fresco y seco, usando la galantamina como compuesto de referencia (Figura 32).

Figura 32. Curva de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por la Galantamina.



La primera curva realizada fue la de la galantamina, el compuesto de referencia para esta actividad; este alcaloide natural mostró una concentración inhibitoria media muy baja. En la Figura 32 se muestra la gráfica de % de inhibición vs concentración (M) para este compuesto y en la tabla 10 se muestra sus valores.

Figura 33. Microplaca de lectura experimental con dos muestras, con diluciones seriadas A₁ hasta A₁₂. Se incluyó una fila de blancos para cada muestra y dos filas de control.



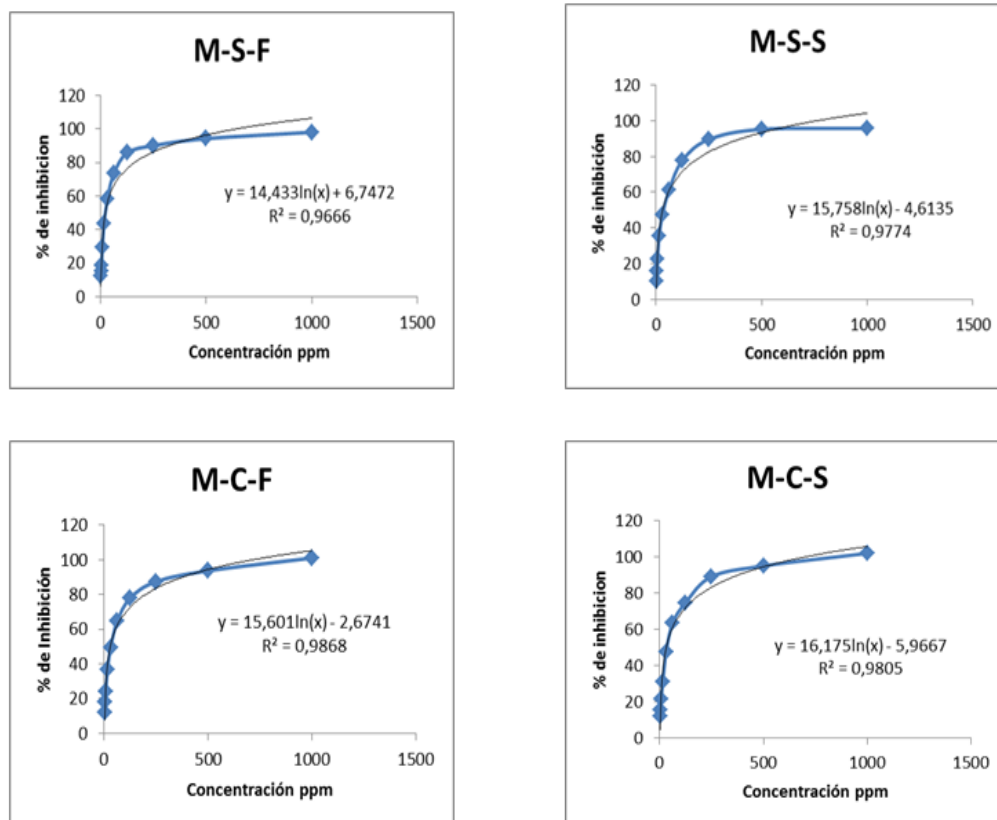
Control: (50µL PBS+ 50µL sln enzimática + 100µL sln sustrato)

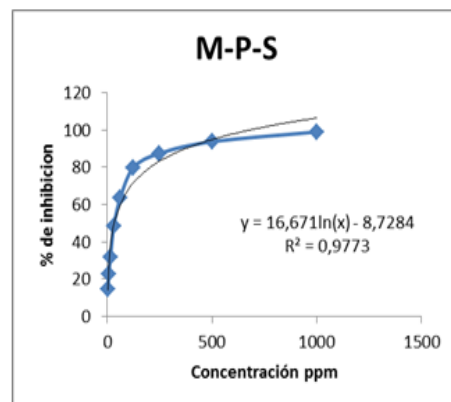
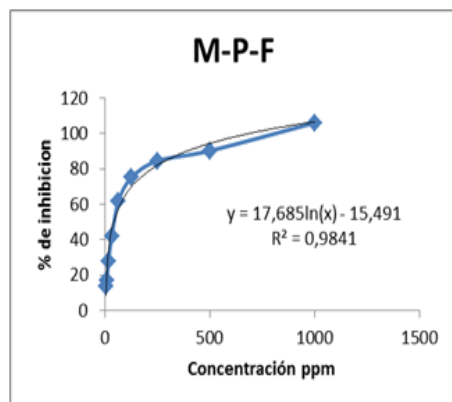
Blanco: (100µL de PBS + 100 µL sln sustrato)

En la figura 33 se observa el incremento del color amarillo producido por la tiocolina, cuando ésta reacciona con el ion ditiobisnitrobenzoato para formar el anión del ácido tiobisnitrobenzóico que es de color amarillo (Figura 6m). De esta forma es posible establecer la actividad enzimática de los extractos.

A continuación se analizaron las muestras de los extractos etanólicos de semilla, cáscara y pectina en estado fresco y seco. Los resultados de las gráficas se muestran en la figuras 34 y sus valores se recogen en la tabla 11.

Figura 34. Curvas de los ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por los extractos etanólicos de la (semilla, cáscara y pectina) del fruto del cacao.





M-S-F: muestra semilla fresca; M-S-S: muestra semilla seca; M-C-F: muestra cáscara fresca; M-C-S: muestra cáscara seca; M-P-F: muestra pectina fresca; M-P-S: muestra pectina seca.

Posteriormente fueron analizados los extractos usando la ecuación de la curva dada por las anteriores gráficas, se calculó el IC₅₀ para cada muestra y fue definida como la concentración requerida para conseguir el 50% del máximo efecto inhibitorio. (Ver tabla 11)

Tabla 11. Resultados de inhibición *in vitro* de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) por los extractos de cacao y muestras de referencia.

MUESTRA	CONCENTRACIÓN (ppm)	IC ₅₀ (µg/mL)± SD	CV (%)
Galantamina	-	0,28	0,88
Vitamina E*	-	42,0	9,76E-05
S-F	2000	23,91±0,68	2,67
C-F	2000	34,69±1,28	3,81
P-F	2000	35,49±0,75	2,14
S-S	2000	19,36±0,90	4,64
C-S	2000	31,53±1,06	3,47
P-S	2000	27,00±0,65	2,39

*Vitamina E, adaptada de la literatura.⁸⁹

La Galantamina, empleada como sustancia control, es un medicamento aceptado para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.⁷¹

Como se observa en la tabla 11, todos los extractos evaluados, lograron inhibir la acetilcolinesterasa por debajo de los 35,49 (µg/mL), aunque ninguno de éstos superó la actividad de la galantamina, la cual dio una inhibición de 0,28 (µg/mL).

La muestra que presentó mayor inhibición fue la semilla seca con 19,36 µg/mL, seguido de la muestra de semilla fresca con 23,91 (µg/mL) la pectina seca y

cáscara seca, también podemos observar que las muestras secas presentaron mayor actividad, que las muestras frescas.

La muestra de Vitamina E, logró inhibir 42,0 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) siendo un valor superior al de los extractos de cacao, lo cual quiere decir que las muestras de cáscara, pectina y semilla tienen una mayor inhibición frente a la acetilcolinesterasa (AChE), debido que estuvieron por debajo de 35 ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

No se encontraron estudios similares efectuados en especies de este género para poder realizar una comparación con la literatura. Sin embargo, se infiere que dicha actividad podría ser atribuida fundamentalmente a la presencia de los compuestos fenólicos, en las muestras del cacao.⁹⁴ Pero los alcaloides también podrían aportar a dicha actividad colinérgica.

Una de las posibles estrategias para combatir la enfermedad del Alzheimer, es desarrollar un grupo de fármacos, los cuales, se han dirigido a la prevención de los procesos neurodegenerativos que finalmente provocan daño irreversible en el cerebro (péptido β -amiloide) ($A\beta$); Por lo tanto, cualquier agente que impida la génesis y depósito de $A\beta$ será útil para impedir el progreso de la enfermedad.⁹⁵

En la literatura se reporta que los principales flavonoides del cacao, epicatequina y catequina, inhiben la proteína amiloide beta inducida por la apoptosis y sugieren que el cacao puede tener efecto anti-neurodegenerativa, además de otros efectos quimiopreventivos que se le adjudican.⁹⁶

A continuación se hizo una relación entre la cantidad de compuestos fenólicos presentes en las muestras de cacao frente a la actividad de inhibición de acetilcolinesterasa. (Ver tabla 12)

Tabla 12. Relación de polifenoles totales y flavonoides totales presentes en el ensayo de acetilcolinesterasa.

Muestra	Peso extracto seco en la AChE (mg)	Peso extracto seco PT (mg)	PT (mg AG/ g extracto seco)	Peso extracto seco FT	FT (mg quercetina/ g extracto seco)	Relación PT con AChE (mg AG/ g extracto seco)	Relación FT en AChE (mg quercetina/ g extracto seco)
SF	2	4,3	75,72	5,2	0,15	34,9	5,70E-02
CF	2	4,9	39,65	8,6	0,07	16,1	1,58E-02
PF	2	13,3	6,07	50,1	0,01	0,9	4,96E-04
SS	2	3,9	42,82	5,0	0,20	22,0	7,94E-02
CS	2	4,6	16,55	8,2	0,11	7,2	2,60E-02
PS	2	14,3	5,94	31,8	0,04	0,8	2,45E-03

Como se observa en la tabla 12, la relación de AChE frente a los compuestos fenólicos, la actividad inhibitoria mostrada por la semilla seca y fresca puede ser atribuida a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los extractos, pero la actividad inhibitoria de la pectina fresca y seca no puede ser atribuida a los polifenoles ni a los flavonoides, puesto que, en los extractos se presenta una muy baja concentración de dichos compuestos.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron extractos etanólicos de semilla, cáscaras y pectinas secas por el método de EAU, obteniendo rendimientos entre 3, 2- 6.5%.

El contenido de polifenoles totales presentes en los extractos etanólicos del fruto de cacao, (cáscaras, semillas y pectinas) por el método de Folin-Ciocalteu, presento valores promedio entre 5,9 y 75,7 mg ácido gálico/g extracto. La muestra que mayor contenido de polifenoles totales mostro fue la muestra de semilla fresca>semilla seca> cáscara fresca>cáscara seca. Los valores obtenidos experimentalmente se encuentran dentro los rangos o incluso por encima de los valores reportados en la literatura.

El contenido de flavonoides totales en los extractos etanólicos del fruto de cacao, (cáscaras, semillas y pectinas) determinado por el método colorimétrico con $AlCl_3$, muestra los mejores resultados para las muestras de semilla seca (0,2 mg quercetina/g extracto) y semilla seca (0,15 mg quercetina/g extracto). Los valores de flavonoides totales se ubican dentro de los rangos reportados por la literatura para la semilla del cacao.

Las muestras de pectina fresca y seca, presentan una muy baja concentración de compuestos fenólicos.

Los ensayos de actividad antioxidante mostraron que los extractos etanólicos del fruto de cacao, presentaron una menor actividad comparada con los antioxidantes BHA, BHT. Sin embargo, las muestras de cáscara y semilla presentaron capacidad anti-rradicalaria mayor a la del antioxidante natural Vitamina E.

La determinación de actividad antioxidante, mostró valores de TAA entre $116,2 \pm 3,5$ y $1412,69 \pm 37,69$ (mmol de Trolox/Kg extracto). Las muestras que mostraron mayores capacidades antioxidantes en los extractos fueron semilla fresca y cáscara fresca.

El aumento de la actividad antioxidante en los diferentes extractos, coincide con el contenido de fenoles totales, mostrando una posible correlación entre estos metabolitos y la actividad antioxidante en el fruto del cacao.

Todos los extractos evaluados mostraron inhibición frente a la enzima acetilcolinesterasa, la muestra que obtuvo mayor inhibición fue la semilla seca con $19,36 \mu\text{g/mL}$.

Las muestras de pectina fresca y pectina seca lograron inhibir 35,49 y 27,00 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, dicha actividad inhibitoria no se atribuye a la presencia de compuestos fenólicos puesto que en estas muestras no se reportaron cantidades representativas de ellos, esta actividad inhibitoria podría atribuirse a la presencia de otro tipo de compuestos presentes en las muestras de pectina del fruto de cacao.

7. DIVULGACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de la investigación fueron presentados en los siguientes eventos, con modalidad de poster, titulados:

1. Se presentó el **poster** titulado: “Determinación de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos etanólicos del fruto del cacao (*Theobroma cacao*) obtenidos por extracción asistida por ultrasonido”, XIX Simposio Nacional de Química Orgánica, sociedad Argentina de investigación en química orgánica. Mar de plata- Argentina. Noviembre 16 al 19 de 2013. (Anexo L)
2. Finalmente, los resultados de la investigación fueron presentados con la **poster** titulado: “Determinación de la capacidad antioxidante y contenidos totales de polifenoles y flavonoides de la cascara, pectina y semilla del fruto del *Theobroma Cacao*”. XII congreso colombiano de fitoquímica. Cartagena de Indias. Mayo 21 al 15 de 2014. (Anexo M)

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Jaen, J.C., Moos, W.H., Johnson, G., Cholinomimetics and Alzheimer's disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**, 2(8), 777-780.
2. Seyhan E. Química Orgánica estructura y reactividad, Loreto Barcelona. Editorial Reverte, S.A., 2000, Vol. 2, p. 1104.
3. López, r., Echeverri, F., ¿Son seguros y efectivos los antioxidantes? *Scient. Et. Tech.* **2007**, 8, 41-44.
4. Dr. Harold E. Varmus, director del NCI Informe Anual a la Nación sobre el Estado del Cáncer. Reseña actualizada de los índices de incidencia y mortalidad por cáncer. [<http://www.cancer.gov/diccionario?cdrid=703278>] (consultado el 02 de febrero 2015).
5. Samadi, A., Revenga, M., Iriepa, I., Moraleda, I., Synthesis pharmacological assessment, and molecular modeling of 6-chloro-pyridonepezils. New dual AChE inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease. *European J.Med.Chem.* **2013**, 67, 64-74.
6. Shapira, ET AL., Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **1992**, 32,116-124.
7. Casanovas, A., Larousse diccionario esencial química. Editorial Larousse, S.A. México. 1 Edición. 2006, p 187.
8. Gil, A., Tratado de nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. Editorial Médica Panamericana, Madrid. 2. Edición. 2010, p.395.
9. Rubinsztein, D.C., The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. *Nature.* **2006**, 443, 780–786.
10. Enciclopedia de la salud dietética y psicológica, disponible en <http://www.encyclopediasalud.com/definiciones/pectina>, (consultado el 12 de febrero del 2015).
11. Weininger, S., Química Orgánica. Barcelona. Editorial Reverte, S.A. 1988. p. 986.
12. Pereto, J., Sendra, R., Pamblanco, M., Fundamentos de bioquímica. Catalán. 1 Edición. 1996. p.109

13. Smith, L.O., Cristol, S.J., Química Orgánica, Editorial Reverte. S.A. Barcelona. 6. 1972. pp. 550-551.
14. Bustamante, E. El sistema nervioso, desde las neuronas hasta el cerebro humano. Editorial Universidad de Antioquia, Colombia, 2007, p.91.
15. Harleen, S., Bimlesh, K., Sunil, P., Prashant, T., Manoj, S., Pardeep, S., A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int. Pharm. Sci.* **2011**,1,25-29.
16. Wollgast, J., Anklam, E., Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health. *Food. Res. Int.* **2000**, 33, 449 – 459.
17. Kalvatchev, Z; Garzaro, D; Guerra C, Franklin., *Theobroma Cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. *Agroalimentaria.* **1998**, 6, 23.
18. Carl, I.K., Roberta, R.H., Patricia I.O, César G.F, Schmitz, H., Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *J. Clin. Nutr. Jan.* **2005**, 81, 298-303.
19. Adewusi, E., Steenkamp, V., *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa *Asian Pacific. J. Tro. Med.* **2011**,6 ,829-835.
20. Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food. Drug. Anal.* **2002**, 10, 178-182.
21. Özcan, E. Ultrasound assisted extraction of phenolics from grape pomace. *Middle East Technical. University. Department of Chemical Engineering.* Enero, 2006, p. 57-59.
22. Zheng, W.; Wang, S.; Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, 49, 5165-5170.
23. Ellman, G. L., Courtney, D., Andres V.R., Featherstone, R. M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacology.* **1961**,7, 88-95.
24. Gimeno, E., Compuestos fenólicos, un análisis de sus beneficios para la salud. **2004**, 23, 80-84.
25. Miller, E.G., Peacock, T., Jason J, Bourland, C.T., Wright, J.M., Inhibition of oral carcinogenesis by citrus flavonoids. *Nutr. Cancer.* **1997**, 60, 69-74.

26. Murainaa, I.A., Suleimanb, M.M., Eloffb, J.N., Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts. *Phytomedicine*. **2009**, 16, 665–668.
27. Trípoli, E, Guardia, M.L., Giammanco, S, Majo, D., Giammanco, M., Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties. *A rev. Food. Chem.* **2007**, 104, 466-479.
28. Milardovića, S., Ivekovićb, D., Grabarićb, B., A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*. **2006**, 68,175–180.
29. Disponible en <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Corpoica/Corpoica.asp> (consultado 20 de febrero del 2015).
30. Citadel, A., Redencion, B., Reyes, I., Agojo, R., Jazel, Z., Hazel, D., Lorwin, E., Actividad antibacteriana de cacao (*Theobroma cacao Linn.*) Extracto crudo respecto de algunas bacterias aisladas. *Multidisciplinary. J.* **2010**, 4, 269-281.
31. Tim, C., Andrew J.L., Antimicrobial activity flavonoids, international *J. Antimicrob. Agents.* **2005**, 26, 343-356.
32. Primo, E. Química orgánica clásica y aplicada de la molécula a la industria. Tomo II. Editorial Reverte S.A. Barcelona, 2007. p. 916.
33. Carlo, D., Nicola, M, G., Izzo, A., Capasso, F., Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. (Minireview). *Life. Sci.* **1999**, 65, 337-353.
34. Deanna, M., Hasegawa, M., Fotoquímica Orgánica, Segunda Edición, Editorial Torino Caracas: U.C.V., Copyright. 2002. p.141-162.
35. Martínez, F, S., González, J., Culebras, T., Los flavonoides propiedades y acciones antioxidantes, *Nutr. Hosp.* **2002**, 6, 271-278.
36. Mrkham, K., Oyvind, A., Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and applications. USA: Taylor & Francias Group, 2006. pp. 397 – 414.
37. Ríspoli, L., Tarragon, V, A., Prado, G., Tormo, Z., Mahmoud I, A., Gumbau, P, V., Estrés oxidativo; estudio comparativo entre un grupo de población normal y un grupo de población obesa mórbida. *Nutr. Hosp.* **2013**, 28, 3-5

38. Tripoli, G., Giammanco, S., Majo, D.I., Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A. *Review. Food. Chem.* **2007**, 104, 466-479.
39. Nagendran, A, B., Kalyana, S, B., Samir, S, A., Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, Analytical, Nutritional and Clinical Methods. *Food. Chem.* **2006**, 99, 191–203.
40. Martinez, C., Hector, O., La Cadena de cacao en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. Observatorio Agro – Cadenas. 2005. pp. 2 – 49.
41. Jaimes, S., Yeirme, A, H., Manejo de las enfermedades del cacao (*Theobroma cacao L.*) en Colombia, con énfasis en monilia (*moniliophthora roreni*) Colombia. Corpoica 2010. p. 90.
42. Kim, H., Keeney, P, G. (-)-Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food. Sci.* **1984**, 49, 1090-1092.
43. Fernando, I., Sánchez, E., Guía ambiental para el cultivo del cacao, Segunda edición, Diciembre de 2013.
44. Cacao cultura en el departamento de Cundinamarca, FEDECACAO, Bogotá, Noviembre de 2004, pp.5-6.
45. Chacón, R, I., Ramis, C., Gómez, C., Descripción morfológica de frutos y semillas del cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao L.*) en el Sur del Lago de Maracaibo *Rev. Fac. Agron.* **2011**, 28 ,1-13.
46. Mojica, P., Amilcar, P, V., Características del cultivo del cacao en Santander Bucaramanga. Centro Regional de Estudios Económicos. 2006, p. 38.
47. Wachter, R., Microorganismos y chocolate. *Revista Digital Universitaria.* **2011**, 12, 1-9.
48. Salamanca, G., Guillermo, F. Zapata, R., Osorio, T., Flora apícola indicadora departamento del Tolima. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. 2004. p. 6 - 11.
49. Jalil, A., Ismail, A., Polyphenols in cocoa and cocoa products Is there a link between antioxidant properties and health. *Molecules.* 2008,13, 2190 -2219.

50. Adeyemi, O., Stephen A.O., Ashwell, A.R., Jeffrey F.N., Johannes Van S.F., Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibition, iridoid content and mutagenic evaluation of *Leucosidea sericea*. *Food. Chem. Tox.* **2011**, 49, 1122–1128.
51. Martínez, R., Torres, P., Meneses, M.A., Figueroa, J.G., Pérez, J.A., Chemical, technological and in vitro antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao L.*) coproducts, *Food. Res. Int.* **2012**, 49, 39-45.
52. Ignat, L., Volf, I., Popa, V, I., A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2011**, 126,1821–1835.
53. Zill, H., Muhammed, K., Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrason. Sonochem.* **2011**, 18, 813–835.
54. Azuela, R., Vargas, P., Extracción de sustancias asistidas por ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha.* **2007**,20, 30-40.
55. Ioana, I., Irina V., Valentin, I., A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2011**, 126,1821–1835.
56. Deanna, M., Hasegawa, M., Fotoquímica Orgánica, Segunda Edición, Editorial Torino Caracas: U.C.V., Copyright. 2002. pp.141-162.
57. Farid, C., Zill, H., Muhammed K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, *preservation and extraction.* *Ultrason. Sonochem.* **2011**,18, 813–835.
58. For more information and technical specifications. [online]. Disponible en internet: <URL: \ <http://www.biochrom.co.uk/product/85/biochrom-ez-read-400-microplate-reader-.html>> (consultado 10 de Noviembre del 2014).
59. Shwetha, K, P., Latha, B., Pushpa, A., phytochemical screening and evaluation of in-vitro antioxidant activity, total phenolics and total flavonoids of holarrhena antidysentrica leaf extracts, *Int. J. Res. Pharm. Chem.* **2011**. (1)3, 2231-2728.
60. Tapas, A, R., Sakarkar, D, M., Kakde, R, B., Flavonoids as nutraceuticals: A Review. *Trop. J. Pharm. Res.* **2008**, 7,1089-1099.

61. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobliya, D.J., Flavonoids antioxidants Chemistry, metabolism and structure activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* **2002**, 13, 572-584.
62. Martínez, J. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus Terebinthinaceus*. Tesis. Universidad tecnológica de la mixteca, Huajuapán de león, Oaxaca, Junio 2007. P. 65.
63. Hillwell, B., Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or constipation. *The Lancet* .**1994**, 2, 721-724.
64. Sellapan, S., Akoh, C., Krewer. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. *J. Agric. Food Chem.***2002**, 50, 2432-2438.
65. Valco, M., Leibfritz, D., Moncola, M., Cronin, T., Mazur, M., Telser, J., Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2007**, 39,44-84.
66. Andreas, M., Cruz, J, M., Francob, J., Domõânguez, M., Et. al. Natural antioxidants from residual sources. *Food. Chem.* **2001**, 72, 145-171.
67. Zheng, W., Wang, S., Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs, *J. Agric. Food. Chem.* **2001**, 49, 5165-5170.
68. Hocman G., Chemoprevention of cancer: phenolic antioxidants (BHT, BHA). *Int. J. Biochem.***1988**, 20,639-51.
69. Eivind, H., Victoria B., Bohne, K., Augustine A., Hepatic retention and toxicological responses during feeding and depuration Periods in Atlantic Salmon Fed Graded Levels of the Synthetic Antioxidant, Butylated Hydroxytoluene. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56 ,11540–11549.
70. Chen, C., Bertin, Z., Froidj, R., Estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs, *Food. Chem.* **2013**, 414–420.
71. Joseph, J., Topczewski, A. M., Lodge, S. N., Yasapala, M. K., Payne, P. M., Keshavarzi, D.M., Quinn., Reversible inhibition of human acetylcholinesterase by methoxypyridinium species. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, 23, 5786–5789.
72. Savolainen, K., Understanding the toxic actions of organophosphates. En: kriegler, R.I Handbook of pesticides toxicology. Principles. London: Academic Press, 2001.pp. 1013-1041.

73. Felman, H. H., Atlas of Alzheimer's disease. London: Informa UK Ltd., 2007. p.141.
74. Floegela, A., Kimb, D., Chungc, S., Kooa, S., Chun., Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food. Comp. Anal.* **2011**, 24,1043–1048.
75. Griffiths, G., Walsh, M., Harwood, J., Acylthioesterase activity in developing seeds of cocoa. *Phytochemistry*.**1993**, 32, 1403-1405.
76. Serafini, M., Bugianesi, R., Maiani, G., Valtuena, S., Santis, S., Crozier, A., Plasma antioxidants from chocolate. *Nature*, **2003**, 424,1013.
77. Roberts, M., Cocoa nutrient for 'lethal ills' (BBC NEWS: 2007/03/11) Available from <http://news.bbc.co.uk/go/pr/fr/-/2/hi/health/6430777.stm>.(consultado 6 de Diciembre del 2014).
78. Bayard, V., Chamorro, F., Motta, J., Hollenberg, N., Does Flavanol Intake Influence Mortality from Nitric Oxide-Dependent Processes Ischemic Heart Disease, Stroke, Diabetes Mellitus, and Cancer in Panama. *Int. J. Med. Sci.* **2007**, 4, 53-58.
79. Valente T., Hidalgo, J., Bolea, I., Ramírez B., Reguant, J., Morelló, J.R., Gutiérrez, C., M., Unzeta, M., A diet enriched in polyphenols and polyunsaturated fatty acids, LMN diet, induces neurogenesis in the subventricular zone and hippocampus of adult mouse brain. *J. Alzheimer's Dis.* **2009**, 18, 4.
80. Ooshima, T; Osaka, Y., Sasaki, H., Osawa, K., Yasuda, H., Matsumura, M. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in vitro and animal experiments. *Arch. Oral. Biol.* **2000**, 45, 639 – 645.
81. Nogueira, L., Ramirez, I., Guy, A., Murphy, A., (-)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. *J. Phys.* **2011**, 4615-4631.
82. Martínez, R., Torres, P., Meneses, M.A., Figueroa, J.G., Pérez, J.A., Chemical, technological and *in vitro* antioxidant properties of cocoa (*Theobroma cacao* L.) coproducts, *Food. Res. Int.* **2012**, 49, 39-45.
83. Cuéllar, G. O., Obtención del extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y evaluación de su actividad antibacteriana, Universidad tecnológica de Pereira. 2010. pp.8-14.

84. Jimenes, P.L., Macias, M.P., Ultrasound asisted method for extraction of *Theobromine* and caffeine from cacao sedes and chololate products. *Food bioprocess. tech.* **2013**, 6, 3522-3529.
85. Nuevas evidencias de los efectos beneficiosos de los polifenoles del cacao contra enfermedades neurodegenerativas *Medicina* 21 – Ediciones.Farmavet.<http://www.medicina21.com/EnfermedadesAlzheimer-V3738>. (consultado el 16 de Abril del 2013).
86. Wang, J., Varghese, O. K., Yamada, M., Levine, S., Tzavaras, N., Cocoa extracts reduce oligomerization of amyloid- β : implications for cognitive improvements in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* **2014**, 2, 643-50.
87. Zapata, S., Tamayo, A., Rojano, B., Efecto del Tostado Sobre los Metabolitos Secundarios y la Actividad Antioxidante de Clones de Cacao Colombiano. *Rev.Fac.Nal.Agr.* **2015**. 68(1): 7497-7507.
88. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice, E. C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free. Rad. Biol. Med.* **1999**, 26, 1231-1237.
89. Muñoz, A., Vargas, L., Stashenko, E., Kouznetsov, V., Improved Trolox equivalent antioxidant capacity assay for efficient and fast search of new antioxidant agents. *Anal. Chem. Lett.* **2011**, 1, 86-102.
90. Miller, K., Stuart, D., Smith, N., Lee C, Mchale, N., Flanagan, J., *J. Agr. Food. Chem.* 2006; **54**, 4062-4068.
91. Aidé, J., Perea, V. T., Cadena, C. J., Herrera, A., The cocoa and its products as antioxidant source: Processing effect. *Salud UIS.* **2009**, 41, 128-134.
92. Osman, H., Nasarudin, R., Lee, S., Extracts of cocoa (*Theobroma cacao* L.) leaves and their antioxidation potential. *Food Chem.* **2004**, 86, 41 – 46.
93. Schlesier, H., Böhm, B., Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free. Rad. Res.* **2002**, 36, 177– 187.
94. Roddick, J.G. The acetylcholinesterase- inhibitory activity of steroidal glycoalkaloids and their aglycones. *Phytochemistry*, **1989**, 28, 2631 – 2634.
95. Kumar, S.S., Cerebral amyloid angiopathy: pathogenetic mechanisms and link to dense amyloid plaques. *Genes. Brain. Behav.* **2008**, 7, 67-82.

96. Heo, H.J., Lee, C.Y., Epicatechin and catechin in cocoa inhibit amyloid beta protein induced apoptosis. *J. Agric. Food. Chem.* **2005**, 53(5),1445-8.
97. Corti, R., Andreas, J., Flammer, M., Norman, K., Hollenberg, M, D., Cocoa and Cardiovascular Health, Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine. *Circulation.* **2009**, 119, 1433-1441.

ANEXOS

ANEXO A. Análisis bromatológico como caracterización del material vegetal de la semilla, cáscara y pectina del fruto de *Theobroma cacao L.*

	LABORATORIO DE ALIMENTOS -CICTA-	INFORME DE ENSAYO	FOITIE.01
			Versión: 03
			Página 1 de 2

INFORME DE ENSAYO **Número: 207-15**

FECHA: Abril 17 de 2015
NOMBRE/EMPRESA: Eileen Guerra
DIRECCIÓN: Cra 1ª manzana G Casa 30
TELÉFONO: 3173767509

CÓDIGO DE LA MUESTRA: M206-15
PRODUCTO: cáscara de cacao

FECHA DE RECEPCIÓN: Abril 8 de 2015
REALIZACIÓN DEL ANÁLISIS: Abril 10 a Abril 15 de 2015.

DESCRIPCIÓN DEL ANÁLISIS:

1. La humedad se determinó por medio de secado en estufa siguiendo la metodología descrita en la Norma internacional AOAC 931.04 18th Edición.
2. La determinación de cenizas se realizó en un horno hasta peso constante siguiendo la Norma internacional AOAC 972.15 18th Edición.
3. La proteína fue analizada por el método de Kjeldahl basado en AOAC 970.22 Ed.18:2005
4. La determinación de grasa se realizó por extracción con solvente en equipo Soxhlet siguiendo la Norma internacional AOAC 963.15 Ed.18:2005
5. La fibra cruda se llevó a cabo siguiendo la norma internacional AOAC 930.20 18th Edición mediante una hidrólisis básica y ácida a la muestra.
6. Los carbohidratos totales y el valor calórico fueron calculados matemáticamente según la resolución 333 del 2011 del Ministerio de Protección Social.

Anexo B. Tabla de resultados % de humedad relativa para la semilla, cascara y pectina.

Muestra	Muestra fresca (g)	Muestra seca (g)	% Humedad
M1-Semilla	35,1361	23,7063	32,5301
M2-Cascara	30,4775	7,5706	75,1600
M3-Peptina	35,3484	3,9130	88,9302
M1-Semilla	30,0163	20,4655	31,8187
M2-Cascara	30,9883	7,8493	74,6701
M3-peptina	30,7439	3,6954	87,9801
M1-Semilla	30,0095	20,0343	33,2401
M2-Cascara	30,4579	7,1058	76,6701
M3-Peptina	30,2062	3,3196	89,0102

Anexo C. Tabla de porcentaje (%) de rendimiento de extracción de los extractos obtenidos en estado fresco.

# MUESTRA	PARTE DEL FRUTO	PESO DEL MATERIAL (g)	PESO BALÓN VACÍO (g)	PESO BALÓN LLENO (g)	RESTA DE BALÓN	RENDIMIENTO (%)	DE
M1	Semilla	35,1361	157,8808	160,003	2,1222	6,04	0,7255
M2	Semilla	30,0163	150,4214	151,9996	1,5782	5,26	
M3	Semilla	30,0095	167,4348	168,8124	1,3776	4,59	
M1	Cascara	30,4775	128,542	129,2926	0,7506	2,46	1,3545
M2	Cascara	30,9883	180,8790	182,2910	1,411	4,55	
M3	Cascara	30,4579	98,4916	100,0145	1,5229	5,00	
M1	Pectina	35,3484	106,2074	107,7487	1,5413	4,36	0,7217
M2	pectina	30,7439	135,5238	136,9915	1,4677	4,77	
M3	Pectina	30,2062	146,8955	147,9133	1,0178	3,37	

*DE: desviación estándar.

Anexo C. Tabla de porcentaje (%) de rendimiento de extracción de los extractos obtenidos en estado seco.

# MUESTRA	PARTE DEL FRUTO	PESO DEL MATERIAL (g)	PESO BALÓN VACÍO (g)	PESO BALÓN LLENO (g)	RESTA DE BALÓN	RENDIMIENTO	DE
M1	Semilla	30,8265	115,3193	117,3193	2	6,49	1,8151
M2	Semilla	30,5678	157,8737	158,783	0,9093	2,97	
M3	Semilla	30,063	158,1	159,41	1,31	4,36	
M1	Cascara	30,0258	157,8406	158,8069	0,9663	3,22	1,7927
M2	Cascara	30,1198	135,5347	137,5675	2,0328	6,75	

M3	Cascara	30,2157	105,1849	106,8538	1,6689	5,52	0,3770
M1	Pectina	30,0556	115,3185	116,9748	1,6563	5,51	
M2	pectina	30,6568	141,9092	143,6453	1,7361	5,66	
M3	Pectina	30,3918	110,7645	112,2681	1,5036	4,95	

Anexo D. Curva de calibración Acido galico, para la deteminación de polifenoles totales a 765 nm.

	50 ppm	100 ppm	150 ppm	250 ppm	500 ppm
1	0,0642	0,1358	0,2117	0,3757	0,7580
2	0,0653	0,1353	0,2118	0,3762	0,7591
3	0,0657	0,1357	0,2122	0,3766	0,7600
4	0,0662	0,1358	0,2128	0,3769	0,7605
5	0,0664	0,1359	0,2132	0,3772	0,7610
6	0,0671	0,1362	0,2137	0,3779	0,7616
prom	0,0658	0,1358	0,2126	0,3768	0,7600
Desv Est.	0,00100	0,00030	0,00080	0,00076	0,00133
%DESV. REL	1,5237	0,2222	0,3749	0,2013	0,1743

Anexo E. Cálculos para la determinación de polifenoles totales (PT)

A partir de la ecuación de la pendiente dada por la gráfica 24, y reemplazando “y” por la absorbancia de las muestras de cacao, se obtuvieron los resultados que se enuncian en la tabla 6:

De la gráfica 24, se obtiene la ecuación de la recta:

$$y = 0,0016x - 0,016 \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$R^2=0,9998$$

Se despeja “x” que es la concentración en ppm de la muestra.

$$X = \frac{y + 0,016}{0,0016} * Fd$$

$$X = \frac{0,6657nm + 0,016}{0,0016} * \frac{10,02mL}{0,02mL}$$

$$X = \frac{0,6657nm + 0,016}{0,0016} * 501$$

$$X = 213460 \text{ mg ácido gálico/L} \quad (\text{ecuación 2})$$

Fd: factor de dilución.

- Tomando como ejemplo, la muestra

$$\text{factor de dilución} = \frac{\text{Voumen Final}}{\text{Volumen inicial}} = 501$$

El mismo procedimiento se realiza para el resto de las muestras lo cual se hace evidenciar en la tabla 6.

Luego se tomaron estos valores y se remplazaron en la siguiente ecuación para obtener la concentración de ácido gálico disponible en las muestras de cacao (semilla, cáscara y pectina):

El resultado de la ecuación 2 se multiplica por 20 μL , que es el volumen de la alícuota tomada de la dilución inicial de 1 ml, con el fin de expresar los resultados en mg de ácido galico (mg AG).

$$213460 \frac{\text{mg ácido gálico}}{\text{L de extracto}} * 2 \times 10^{-5} \text{L alícuota} = 4,2692 \text{mg de ácido gálico (mg AG)}$$

Este resultado expresa la cantidad de ácido gálico en miligramos presentes en 20 μL (0,02 mL). Luego, extrapolamos el resultado a 1 mL, que es la solución preparada inicialmente.

$$\frac{4,2692 \text{ mg AG}}{0,02 \text{ mL}} * 1 \text{ mL} = 213,46 \text{ mg AG}$$

De esta manera sabemos cuántos miligramos de ácido gálico hay en 4,8 mg de extracto tomado inicialmente para el análisis.

Ahora, extrapolamos los resultados de la ecuación anterior para conocer la cantidad de ácido gálico presente en el total de muestra preparada (2122 mg).

$$\frac{213,46 \text{ mg AG}}{4,8 \text{ mg muestra}} * 2122 \text{ mg muestra} = 94163 \text{ mg AG}$$

Finalmente, expresamos los resultados en miligramos de ácido gálico en gramos de muestra fresca.

$$94163 \text{ mg AG} * \frac{1}{1000} \text{ gramos de muestra} = 94,163 \text{ mgAG} / \text{g extracto seco}$$

Anexo F. Resultados muestras semilla, cáscara y pectina (polifenoles totales).

Muestra	mg ácido gálico/L	mg ácido gálico	mg ácido gálico	mg ácido gálico	mg AG/ g extracto seco
M1-S-F	213460,4	4,27	213,46	94376,20	94,38
M1-C-F	191672,2	3,83	191,67	29972,73	29,97
M1-P-F	100353,4	2,01	100,35	10969,84	10,97
M1-S-S	185914,8	3,72	185,91	39314,50	39,31
M2-S-F	217466,4	4,35	217,47	81715,57	81,72
M3-P-F	42307,9	0,85	42,31	3032,46	3,03
M2-C-F	123233,0	2,46	123,23	38640,38	38,64
M3-C-S	40784,0	0,82	40,78	14180,09	14,18
M2-P-F	31190,9	0,62	31,19	2724,93	2,72
M3-S-F	170518,5	3,41	170,52	51066,58	51,07
M3-C-F	181808,2	3,64	181,81	50341,04	50,34
M1-S-S	136510,497	2,73	136,51	62050,23	62,05
M1-P-S	45226,2	0,90	45,23	5632,19	5,63
M2-C-S	24541,2	0,49	24,54	11877,95	11,88
M3-S-S	62073,9	1,24	62,07	27105,60	27,11
M3-P-S	23129,4	0,46	23,13	2318,49	2,32
M2-P-S	82340,4	1,65	82,34	9858,70	9,86
M1-C-S	117191,7	2,34	117,19	23592,16	23,59

Anexo G. Curva de calibración Quercetina, para la determinación de flavonoides totales a 415 nm.

	20 ppm	30 ppm	40 ppm	60 ppm	80 ppm	100 ppm
1	0,1701	0,2595	0,3417	0,5372	0,8717	0,8717
2	0,1678	0,2623	0,3412	0,5363	0,3978	0,8721
3	0,1696	0,2603	0,3424	0,5364	0,3979	0,8732
4	0,1679	0,2612	0,3426	0,5345	0,3967	0,8757
5	0,1687	0,2616	0,3432	0,5340	0,3967	0,8752
6	0,1682	0,2614	0,3433	0,5353	0,3963	0,8734
Prom	0,1687	0,2610	0,3424	0,5356	0,4762	0,8735
Desv	0,00096	0,00102	0,00082	0,00121	0,1938	0,00160
%DESV. REL	0,5677	0,3891	0,2391	0,2257	40,6917	0,1830

Anexo H. Cálculos para la determinación de flavonoides totales presentes en las muestras de cacao.

A partir de la ecuación de la pendiente dada por la figura 28, y reemplazando "x" por la absorbancia de las muestras de cacao, se obtuvieron los resultados que se enuncian en la tabla 8:

De la gráfica 28, se obtiene la ecuación de la recta:

- Tomando como ejemplo, la muestra de semilla fresca

$$y = 0,0088x - 0,053 \quad (\text{Ecuación.1})$$

$$R^2=0,9994$$

Se despeja "x" que es la concentración en ppm de la muestra.

$$X = \frac{y + 0,053}{0,0088} * Fd$$

$$X = \frac{0,6657nm + 0,016}{0,0016} * \frac{5 mL}{0,5 mL}$$

$$X = \frac{0,6657nm + 0,016}{0,0016} * 10$$

$$X = 455 \text{ mg Quercetina /L} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Fd: factor de dilución.

$$\text{factor de dilución} = \frac{\text{Voumen Final}}{\text{Volumen inicial}} = 10$$

El mismo procedimiento se realiza para el resto de las muestras lo cual se hace evidenciar en la tabla 8.

Luego se tomaron estos valores y se remplazaron en las siguientes ecuaciones para obtener la concentración de ácido gálico disponible en las muestras de cacao (semilla, cáscara y pectina):

El resultado de la ecuación 2 se multiplica por 500 μL , que es el volumen de la alícuota tomada de la dilución inicial de 1 ml, con el fin de expresar los resultados en mg de quercetina.

$$455 \frac{\text{mg quercetina}}{\text{L de extracto}} * 5 \times 10^{-4} \text{L alícuota} = 0,2275 \text{ mg de Quercetina}$$

Este resultado expresa la cantidad de quercetina en miligramos presentes en 500 μL (0,5 mL). Luego, extrapolamos el resultado a 1 mL, que es la solución preparada inicialmente.

$$\frac{0,2275 \text{ mg quercetina}}{0,5 \text{ mL}} * 1 \text{ mL} = 0,455 \text{ mg de Quercetina}$$

De esta manera sabemos cuántos miligramos de quercetina hay en 5 mg de extracto tomado inicialmente para el análisis.

Ahora, extrapolamos los resultados de la ecuación anterior para conocer la cantidad de quercetina presente en el total de muestra preparada (2122 mg).

$$\frac{0,455 \text{ mg AG}}{5 \text{ mg muestra}} * 2122 \text{ mg muestra} = 193,10 \text{ mg de Quercetina}$$

Finalmente, expresamos los resultados en miligramos de quercetina en gramos de muestra seca.

$$193,10 \text{ mg AG} * \frac{1}{1000} \text{ gramos de muestra} = 0,1931 \frac{\text{mg Quercetina}}{\text{g muestra}}$$

Anexo I. Resultados flavonoides totales.

Muestra	mg quercetina/L de extracto	mg quercetina	mg quercetina	mg quercetina	mg quercetina/g extracto seco
M1-S-F	454,9469697	0,2275	0,45	193,10	0,19
M1-C-F	630,3579545	0,3152	0,63	53,77	0,05
M-P-F	222,6231061	0,1113	0,22	6,93	0,01
M2-S-S	478,1837121	0,2391	0,48	85,26	0,09
M2-S-S	346,6685606	0,1733	0,35	105,21	0,11
M3-P-F	642,25	0,3211	0,64	12,89	0,01
M2-C-F	423,5795455	0,2118	0,42	72,01	0,07
M3-C-S	755,4185606	0,3777	0,76	143,26	0,14
M2-P-F	598,9469697	0,2995	0,60	17,44	0,02
M3-S-F	292,2026515	0,1461	0,29	73,19	0,07
M3-C-F	444,5606061	0,2223	0,44	77,82	0,08
M1-S-S	798,7916667	0,3994	0,80	295,85	0,30
M1-P-S	483,3352273	0,2417	0,48	20,01	0,02
M2-C-S	263,8314394	0,1319	0,26	60,26	0,06
M3-S-S	705,7613636	0,3529	0,71	210,12	0,21
M3-P-S	200,1439394	0,1001	0,20	7,56	0,01
M2-P-S	796,6666667	0,3983	0,80	89,23	0,09
M1-C-S	830,9564394	0,4155	0,83	116,37	0,12

Anexo J. Absorbancias y peso de muestras para la determinación de polifenoles y flavonoides totales.

# Muestra Fresco	parte del fruto	Peso de muestra (mg) polifenoles	Peso de muestra (mg) Flavonoides	Abs PT	Abs FT
M1	Semilla	4,2	5	0,9102	0,3950
M1	Cascara	4,8	8,8	0,5961	0,5494
M1	Pectina	14,1	49,5	0,3045	0,1906
M2	Semilla	4,2	5,2	0,6785	0,2998
M2	Cascara	4,5	8,3	0,3776	0,3674
M2	pectina	16,8	50,4	0,0836	0,5599
M3	Semilla	4,6	5,5	0,5286	0,2518

M3	Cascara	5,5	8,7	0,5646	0,3859
M3	Pectina	14,2	50,5	0,1191	0,5599

# Muestra Seco	parte del fruto	Peso de muestra (mg) polifenoles	Peso de muestra (mg) Flavonoides	Abs PT	Abs FT
M1	Semilla	4,4	5,4	0,4200	0,6976
M1	Cascara	4,8	6,9	0,3583	0,7259
M1	Pectina	13,3	40	0,1284	0,4200
M2	Semilla	4,3	5,1	0,5777	0,4155
M2	Cascara	4,2	8,9	0,0624	0,2269
M2	pectina	14,5	15,5	0,2470	0,3590
M3	Semilla	3	4,4	0,1822	0,6158
M3	Cascara	4,7	8,8	0,1142	0,6595
M3	Pectina	15	39,8	0,0579	0,1708

Anexo K. Resultados muestras Acetilcolinesterasa.

Muestra	Promedio IC 50	D Estándar	CV (%)
M1-S-F	20,1596	0,1667	0,827
M1-C-F	30,8742	1,3955	4,52
M1-P-F	40,8270	0,9548	2,339
M2-S-F	27,5537	1,1012	3,997
M2-C-F	40,8270	0,9548	2,339
M2-P-F	33,7598	0,1627	0,482
M3-S-F	24,0047	0,7632	3,179
M3-C-F	32,3549	1,4792	4,57
M3-P-F	31,8919	1,1467	3,6

Muestra	Promedio IC 50	D Estándar	CV (%)
M1-S-S	30,0907	0,8719	2,90
M1-C-S	32,9519	0,9697	2,94
M1-P-S	29,3553	0,4644	1,58
M2-S-S	19,0089	0,8578	4,51
M2-C-S	25,8792	1,1571	4,47
M2-P-S	29,4003	0,9409	3,20
M3-S-S	19,7209	0,9385	4,76
M3-C-S	35,7483	1,0676	2,99
M3-P-S	22,2472	0,5321	2,39

Anexo L. Poster presentado en el XIX SIMPOSIO NACIONAL DE QUIMICA ORGÁNICA.



DETERMINACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES TOTALES PRESENTES EN LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DEL FRUTO DEL CACAO (*Theobroma cacao*) OBTENIDOS POR EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO.

Karoll D. Herrera, Elen Xiomara guerra, Silvia Vargas, Laura V. Herrera, Martha Cervantes.

Grupo de Investigaciones ambientales para el desarrollo sostenible (GIADS), Santander, Facultad de química Ambiental, Universidad Santo Tomas, sección Bucaramanga, Colombia, marcerv2008@gmail.com.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L, Polifenoles totales, Flavonoides, ultrasonido

Actualmente, polifenoles como flavonoides, han incrementado su demanda en el mundo debido al interés que presentan sus propiedades biológicas tales como antibacteriales, antivirales, anti-inflamatorias, antifúngicas y su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer¹. También por sus diversas aplicaciones en la rama de la salud y la industria química para empresas de pigmentos, cosméticas y farmacéuticas entre otras. Por ello, se propuso el estudio de compuestos tipo polifenoles y flavonoides obtenidos a partir del fruto del cacao, el cual actualmente se cultiva en extensas zonas de la franja colombiana. En el presente trabajo, se determinó la concentración de flavonoides y fenoles totales obtenidos a partir de extractos etanólicos de la cáscara, pulpa y semilla del fruto del cacao (*Theobroma cacao* L.) en estado fresco, empleando la extracción asistida por ultrasonido. Se emplearon los métodos colorimétricos de cloruro de aluminio² y Folin ciocalteau respectivamente, por medio de espectrofotometría UV- Vis. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento de fenoles y flavonoides totales, presentes en extractos de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Parte del fruto	Fenoles mg ácido gálico/ g muestra	Flavonoides mg quercetina/ g muestra	Flavonoides totales/ fenoles totales (g muestra)	% Flavonoides totales/ Fenoles totales (g muestra)
Semilla	60,34	0,83	0,01	1
Cáscara	14,2	0,26	0,02	2
Peptina	4,46	0,03	0,01	1

Como se puede observar en la tabla 1, la semilla del cacao es la parte del fruto en la que se presenta la mayor concentración tiene de polifenoles y flavonoides totales. En la cáscara se presenta también una concentración importante de polifenoles, por lo que se puede considerar su aprovechamiento para la obtención de dichos compuestos de interés en las diversas industrias. Los valores obtenidos experimentalmente se encuentran en un rango superior e igual al reportado en la literatura³.

Referencias:

- HARLEEN, S., BIMLESH, K., SUNIL, P., PRASHANT, T., MANOJ, S., PARDEEP, S. *JPS*. 2011, Vol. 1, p.25-29.
- GHASEMI, K., GHASEMI, J., EBRAHIMZADEH, M., *Park, J. Pharm. Sci.* Julio 2009, Vol. 22, p. 277-281
- MILLER K, STUART D, SMITH N, LEE C, MCHALE N, FLANAGAN J. *J Agr Food Chem.* 2006; **54**: 4062-4068

Anexo M. poster presentado en el XII CONGRESO COLOMBIANO DE FITOQUÍMICA.

P114 (RESUMEN APROBADO #244)

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTENIDOS TOTALES DE POLIFENOLES Y FLAVONOIDES DE LAS CÁSCARAS, PECTINAS Y SEMILLAS DE LOS FRUTOS DE *Theobroma cacao*

DETERMINATION OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND TOTAL POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS CONTENTS OF THE PEELS, PECTINS AND SEEDS OF THE FRUITS FROM *Theobroma cacao*

Karoll D. Herrera¹, Silvia Vargas¹, Solángel Aristizabal², Amner Muñoz Acevedo², Martha Cervantes Díaz^{1*}

¹GLADS, Facultad Química de Ambiental, Universidad Santo Tomás - Seccional Bucaramanga, Carrera 27 No 180-395 Kilometro 6 Vía Floridablanca.

²Grupo de Investigaciones en Química y Biología, Departamento de Química y Biología, Universidad del Norte, Km 5 vía Puerto Colombia, Barranquilla.

* E-mail: marthacervantesdiaz@mail.ustabuca.edu.co

RESUMEN

En el presente trabajo se propuso el aprovechamiento de los residuos de los frutos del cacao (*Theobroma cacao*) para el aislamiento de compuestos de valor agregado tipo polifenoles y flavonoides. Se obtuvieron los extractos etanólicos de cáscaras, pectinas y semillas de los frutos del cacao (*Theobroma cacao*) en estado fresco empleando la extracción con solvente asistida por ultrasonido y se les determinó la capacidad antioxidante y los contenidos totales de flavonoides y polifenoles mediante los ensayos colorimétricos con ABTS^{•+}, AlCl₃ y reactivo de Folin-Ciocalteu. Las muestras del fruto de cacao fueron obtenidas de la Finca el Cerro de la Aurora ubicada en el Municipio de Lebrija, Departamento de Santander. Los rendimientos de los extractos etanólicos estuvieron entre 4-20%. La reactividad de los extractos de cáscaras, pectinas y semillas de cacao, hacia el catión radical ABTS^{•+}, mostró valores de TAA (mmol de Trolox/Kg extracto seco) entre 25±2 y 167818±11778, superando en algunos casos las sustancias de referencia α-tocoferol, BHT y BHA. Por otra parte, el contenido de polifenoles totales (PFT) expresado como equivalentes a ácido gálico (AG) (µg PFTEAG/mg de extracto seco) osciló entre 22±1 y 286±21; mientras que, el contenido de flavonoides totales (FT) expresado como equivalentes a rutina (R) (µg FTER/mg de extracto seco) se encontró entre 8±1 y 724±42.

PALABRAS CLAVES: Cacao; *Theobroma cacao*, Cáscara; Semillas; Pectina; Capacidad antioxidante; ABTS^{•+}; Contenido total de polifenoles; Contenido total de flavonoides.

AGRADECIMIENTOS: Los autores agradecen a la Universidad Santo Tomás Seccional Bucaramanga el apoyo financiero a través de la V Convocatoria Interna de Investigación. Se agradece también a la Universidad del Norte, a través del Área Estratégica en Biodiversidad, Servicios Ecosistémicos y Bienestar Humano y a Colciencias por su apoyo mediante el Programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores 2012.