



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO, AL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO.**

**MODALIDAD TIPO:** Investigación

**TÍTULO:**

**DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA  
CASCARILLA DE CACAO EN POLVO SOBRE LA  
LIPOPEROXIDACIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.**

**AUTORAS:**

- KAREN DAHIAN DÍAZ LÓPEZ
- LISSETTE KATHERINE PILOZO BERNARDINO

**TUTORA:**

Q.F. GLENDA SARMIENTO TOMALÁ, M.Sc.

**CO-TUTORA:**

DRA. ZORAIDA BURBANO, M.Sc.

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**2017**



FACULTAD: CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA: QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN



### FICHA DE REGISTRO DE TESIS/TRABAJO DE GRADUACIÓN

<b>TÍTULO Y SUBTÍTULO:</b>	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA CASCARILLA DE CASCARILLA DE CACAO EN POLVO SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS.		
<b>AUTOR(ES)</b> (apellidos/nombres):	DÍAZ LÓPEZ KAREN DAHIAN PILOZO BARNARDINO LISSETTE KATHERINE		
<b>REVISOR(ES)/TUTOR(ES)</b> (apellidos/nombres):	ADONIS BELLO ALARCÓN, PhD. (REVISOR) GLENDA SARMIENTO TOMALÁ, Msc. (TUTORA)		
<b>INSTITUCIÓN:</b>	UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL		
<b>UNIDAD/FACULTAD:</b>	FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS		
<b>MAESTRÍA/ESPECIALIDAD:</b>			
<b>GRADO OBTENIDO:</b>	TERCER NIVEL – QUIMICO FARMACEUTICO		
<b>FECHA DE PUBLICACIÓN:</b>	13 DE MARZO 2018	<b>No. DE PÁGINAS:</b>	81
<b>ÁREAS TEMÁTICAS:</b>	FARMACOLOGÍA		
<b>PALABRAS CLAVES/ KEYWORDS:</b>	ANTIOXIDANTE, ENDOPERÓXIDOS, HOMOGENATO, LIPOPEROXIDACIÓN, MALONDIALDEHÍDO.		
<b>RESUMEN/ABSTRACT</b> (150-250 palabras):	<p>Durante el estrés oxidativo se alteran biomoléculas como: ADN, proteínas, lípidos (lipoperoxidación), donde se liberan moléculas de malondialdehído producto de la descomposición de endoperóxidos generando enfermedades. Este trabajo se basó en la determinación de la capacidad antioxidante de las cascarillas de cacao sobre la lipoperoxidación en sistemas biológicos utilizando la metodología sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Se realizaron análisis de control de calidad, en la cuantificación de malondialdehído se conformaron 6 grupos con 4 animales, I-control, II-inducción, III- vitamina A, IV.V-VI- 100, 50 y 25 mg/kg de harina, 24 horas antes se administró ácido acetilsalicílico como inductor de lipoperoxidación, se extrajo el hígado se preparó un homogenato que al reaccionar con ácido tiobarbitúrico, se produjo un complejo coloreado determinándose la absorbancia a 535nm. Los resultados microbiológicos determinaron ausencia de microorganismos, en los físico-químicos ausencia de flavonoides y polifenoles 1748 mg de AGE/100g. En dosis de 25, 50,100 mg/kg, la reducción de malondialdehído fue: 0.322, 0.261, 0.418µM respectivamente.</p>		
<b>ADJUNTO PDF:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> NO	
<b>CONTACTO CON AUTOR/ES:</b>	<b>Teléfono:</b> 0960701823	<b>E-mail:</b> <a href="mailto:dahian92@hotmail.com">dahian92@hotmail.com</a> <a href="mailto:Karen.diazl@ug.edu.ec">Karen.diazl@ug.edu.ec</a>	
<b>CONTACTO CON LA INSTITUCIÓN:</b>	<b>Nombre:</b> SEDE CIENCIAS QUIMICAS		
	<b>Teléfono:</b> 052970459		
	<b>E-mail:</b> <a href="http://www.fcq.ug.edu.ec">www.fcq.ug.edu.ec</a>		



**FACULTAD: CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA: QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN**



Guayaquil, enero 2018

**Sr.  
COORDINADOR DE FORMACIÓN  
FACULTAD CIENCIAS QUÍMICAS  
UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
Ciudad.-**

De mis consideraciones:

Envío a Ud. el Informe correspondiente a la tutoría realizada al Trabajo de Titulación "DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA CASCARILLA DE CACAO EN POLVO SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS", de las estudiantes KAREN DAHIAN DÍAZ LÓPEZ y LISSETTE KATHERINE PILOZO BERNARDINO, indicando han cumplido con todos los parámetros establecidos en la normativa vigente:

- El trabajo es el resultado de una investigación.
- El estudiante demuestra conocimiento profesional integral.
- El trabajo presenta una propuesta en el área de conocimiento.
- El nivel de argumentación es coherente con el campo de conocimiento.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de similitud y la valoración del trabajo de titulación con la respectiva calificación.

Dando por concluida esta tutoría de trabajo de titulación, **CERTIFICO**, para los fines pertinentes, que los estudiantes están aptos para continuar con el proceso de revisión final.

Atentamente,

Q.F. Glenda Sarmiento Tomalá

C.I. 0910414135





# URKUND

## Urkund Analysis Result

Analysed Document: •KAREN DAHIAN LISSETTE PILOZO URKUND.docx (D34987118)  
Submitted: 1/24/2018 2:58:00 PM  
Submitted By: campoverdemj@ug.edu.ec  
Significance: 2 %

### Sources included in the report:

•JEAN CARLOS SANCAN MARTHA LLERENA URKUND.docx (D34987108)  
TESIS CARVAJAL M.pdf (D13134134)  
primer avance tesis gabriela segura.doc (D21325271)  
nuevas correccionesavance2-1.doc (D21063416)  
EFECTOS DEL SELENIO ORGÁNICO, VITAMINA E, OMEGA 3 E INTERACCIONES SUPLEMENTADOS  
EN LA DIETA, SOBRE ABSORCIÓN, CALIDAD NUTRICIONAL Y FUNCIONAL DEL MÚSCULO DEL  
CUY (Cavia porcellus) DR. RODRIGUEZ.docx (D30048256)  
[http://ticopedia.wikia.com/wiki/Theobroma\\_cacao](http://ticopedia.wikia.com/wiki/Theobroma_cacao)

### Instances where selected sources appear:

9



*Felipe Gallegos Cuarte*



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN**



**LICENCIA GRATUITA INTRANSFERIBLE Y NO EXCLUSIVA PARA EL USO NO  
COMERCIAL DE LA OBRA CON FINES NO ACADÉMICOS**

Yo, PILOZO BERNARDINO LISSETTE KATHERINE con cédula de ciudadanía N° 092703878-6 y DÍAZ LÓPEZ KAREN DAHIAN con cédula de ciudadanía N°093130597-3 certifico que los contenidos desarrollados en este trabajo de titulación, cuyo título es "DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA CASCARILLA DE CACAQ EN POLVO SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS" es de nuestra absoluta propiedad y responsabilidad Y SEGÚN EL Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN\*, autorizo el uso de una licencia gratuita intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la presente obra con fines no académicos, en favor de la Universidad de Guayaquil, para que haga uso del mismo, como fuera pertinente.

PILOZO BERNARDINO LISSETTE KATHERINE  
CI° 092703878-6

DÍAZ LÓPEZ KAREN DAHIAN  
CI°093130597-3

\*CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN (Registro Oficial n. 899 - Dic. /2016) Artículo 114.- De los titulares de derechos de obras creadas en las instituciones de educación superior y centros educativos.- En el caso de las obras creadas en centros educativos, universidades, escuelas politécnicas, institutos superiores técnicos, tecnológicos, pedagógicos, de artes y los conservatorios superiores, e institutos públicos de investigación como resultado de su actividad académica o de investigación tales como trabajos de titulación, proyectos de investigación o innovación, artículos académicos, u otros análogos, sin perjuicio de que pueda existir relación de dependencia, la titularidad de los derechos patrimoniales corresponderá a los autores. Sin embargo, el establecimiento tendrá una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra con fines académicos.



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN**



---

### **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En calidad de tutora del trabajo de titulación, Certifico: que he asesorado, guiado y revisado el trabajo de titulación en la modalidad de investigación, cuyo título es "Determinación del efecto antioxidante de la cascarilla de cacao en polvo sobre la lipoperoxidación en sistemas biológicos", presentado por: Díaz López Karen Dahian, con cédula de ciudadanía N° 093130597-3 y Pílozo Bernardino Lissette Katherine, con cédula de ciudadanía 0927038786, previo a la obtención del título de Química y Farmacéutica.

Este trabajo ha sido aprobado en su totalidad y se adjunta el informe de Anti plagio del programa URKUND. Lo certifico.

Guayaquil, enero 2018

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Glenda Sarmiento Tomalá".

Q.F. Glenda Sarmiento Tomalá, M.Sc.

**Tutora de tesis**

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "Zoraida Burbano".

Dra. Zoraida Burbano, M.Sc.

**Co- tutora de tesis**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN**



Guayaquil, 7 Marzo 2018

## **CERTIFICADO DEL TUTOR REVISOR**

Habiendo sido nombrado, ADONIS BELLO Ph.D tutor del trabajo de titulación DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA CASCARILLA DE CACAO EN POLVO SOBRE LA LIPOPEROXIDACIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS certifico que el presente trabajo de titulación, elaborado por **DÍAZ LÓPEZ KAREN DAHIAN** con C.I. No. **093130597-3** y **PILOZO BERNARDINO LISSETTE KATHERINE** con C.I. No. **092703878-6**, con mi respectiva supervisión como requerimiento parcial para la obtención del título de QUÍMICO FARMACÉUTICO, en la Carrera Química y Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, ha sido **REVISADO Y APROBADO** en todas sus partes, encontrándose apto para su sustentación.

**ADONIS BELLO Ph.D**

DOCENTE TUTOR REVISOR

C.I. No. 0959948076



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN**



**CERTIFICADO DEL TRIBUNAL**

Acta de Registro de la sustentación Oral

El Tribunal de Sustentación del Trabajo de Titulación la Sra. PILOZO BERNARDINO LISSETTE KATHERINE y la Srta. DÍAZ LÓPEZ KAREN DAHIAN, después de ser examinados en su presentación, memoria científica y defensa oral, da por aprobado el Trabajo de Titulación.

ADONIS BELLO Ph.D

PRESIDENTE – MIEMBRO DEL TRIBUNAL

LAURA VALDEZ LÓPEZ M.SC

DOCENTE–MIEMBRO DEL TRIBUNAL

MARIA ELENA JIMENEZ M.Sc

DOCENTE–MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Abg. FRANCISCO PALOMEQUE

SECRETARIO GENERAL



Universidad de Guayaquil

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA  
UNIDAD DE TITULACIÓN**



---

**CARTA DE AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Guayaquil, Miércoles 14 de Marzo 2018

Nosotras, Karen Dahian Díaz López y Lissette Katherine Pilozo Bernardino, autoras de este trabajo declaramos ante las autoridades de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil, que la responsabilidad del contenido de este Trabajo de Titulación, nos corresponde a nosotras exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil.

Declaramos también de nuestra autoría, que todo el material escrito, salvo el que está debidamente referenciado en el texto. Además ratificamos que este trabajo no ha sido parcial ni totalmente presentado para la obtención de un título, ni en una Universidad nacional, ni una extranjera.

*Karen Díaz López*

DÍAZ LÓPEZ KAREN DAHIAN

C.I. 093130597-3

*Lissette Pilozo Bernardino*

PILOZO BERNARDINO LISSETTE KATHERINE

C.I. 092703878-6

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecimiento eterno a Dios por haber sido mi guía a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por haberme brindado una vida llena de aprendizajes, experiencias y felicidad.

Le doy gracias a mi madre Elsa López por apoyarme en todo momento, por los valores que me ha inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis hermanos y primos por ser parte importante de mi vida, A Ricardo por el apoyo diario, a Valeria, Vanessa, Wendy y Kristel por llenar mi vida de alegrías y amor cuando lo más necesite.

Agradezco a la Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas y docentes por haber forjado en mí los conocimientos, consejos y experiencias necesarias para desarrollarme profesionalmente en esta carrera que amo tanto “Química y Farmacia”.

A mi Tutora Q.F. Glenda Sarmiento Tomalá M.Sc y a mi Co-tutora Dra. Zoraida Burbano, M.Sc por habernos brindado la oportunidad de desarrollar nuestra tesis profesional, brindándonos su apoyo, guía, tiempo, conocimiento, y por facilidades que nos otorgaron en los laboratorios para el desarrollo de la parte experimental de nuestra tesis.

A mis amigos por confiar en mí y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidare.

**KAREN DÍAZ LÓPEZ**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios por su infinita bondad y amor, quien forjo mi camino e iluminó mi sendero en todo momento.

Gratitud a la Universidad de Guayaquil y a la Facultad de Ciencias Químicas por su formación académica en esta bella carrera de Química y Farmacia.

A los docentes de esta Facultad quienes fueron los responsables directos de mi formación académica cumpliendo la misión de aconsejarme, y guiarme con sus conocimientos, experiencias y sanos consejos en esta sacrificada carrera.

A mi Tutora Q.F. Glenda Sarmiento Tomalá M.Sc y a mi Co-tutora Dra. Zoraida Burbano, M.Sc por guiarme con paciencia en el desarrollo de trabajo de tesis a la titulación de Química y Farmacéutica.

Agradezco a mis padres, Teresa y Juan, a mi hija, familia y amigos, principalmente a mi esposo Carlos Castro por entenderme y acompañarme en este largo camino, por ayudarme a no decaer en tan dura decisión de ausentarme por horas de mi hogar y siempre recibir su apoyo incondicional para culminar esta etapa muy importante de mi vida.

Mis más sinceros agradecimientos a todos los que aportaron con un granito de arena para terminar esta etapa y afrontar una nueva con seriedad y madurez siempre con sus apoyos incondicionales para concluir con este proyecto de titulación.

**LISSETTE PILOZO BERNARDINO**

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO .....	xi
AGRADECIMIENTO .....	xii
ÍNDICE GENERAL .....	xiii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xvii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xvii
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	xviii
RESUMEN .....	xix
ABSTRACT .....	xx
INTRODUCCIÓN .....	1
PROBLEMA .....	3
Justificación .....	3
Planteamiento del problema .....	5
Formulación del problema .....	5
Objetivos .....	5
Objetivo General .....	5
Objetivos Específicos .....	5
Hipótesis .....	6
Análisis de Variables .....	6
<i>Variable Dependiente</i> .....	6
<i>Variable Independiente</i> .....	6
<i>Operacionalización de las Variables</i> .....	6
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO .....	8

I.1. <i>Theobroma cacao</i> Linnaeus .....	8
I.1.1. <i>Historia</i> .....	8
I.1.2. <i>Clasificación taxonómica</i> .....	8
I.1.3. <i>Descripción morfológica</i> .....	9
I.1.4. <i>Semilla</i> .....	10
I.1.4.1 <i>Composición química</i> .....	10
I.1.5. <i>Cascarilla de cacao</i> .....	11
I.2. <i>Antioxidantes</i> .....	11
I.2.1. <i>Envejecimiento celular</i> .....	12
I.2.2. <i>Especies Reactivas De Oxígeno (ERO)</i> .....	12
I.2.3. <i>Radicales libres</i> .....	13
I.2.4. <i>Estrés oxidativo</i> .....	14
I.2.5. <i>Sistemas de defensa antioxidante celular</i> .....	14
I.2.6. <i>Clasificación de los antioxidantes</i> .....	14
I.2.6.1. <i>Según su mecanismo de protección</i> .....	15
I.2.6.2. <i>Según su naturaleza química</i> .....	15
I.2.6.2.1. <i>De origen enzimático</i> .....	15
I.2.6.2.2. <i>De origen no enzimático</i> .....	16
I.3. <i>Peroxidación Lipídica</i> .....	16
I.3.1. <i>Productos de la peroxidación lipídica</i> .....	18
I.3.2.1. <i>Malondialdehído</i> .....	18
I.3.2.2. <i>Endoperóxido</i> .....	19
I.3.2.3. <i>Hidroperóxido</i> .....	19
I.4. <i>DAÑO OXIDATIVO</i> .....	19

I.5. GLOSARIO .....	22
CAPÍTULO II. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION .....	24
II.1. Métodos científicos empleados en la Investigación .....	24
II.2. Metodología .....	25
<i>II.2.1. Obtención de la Materia Prima</i> .....	25
<i>II.2.2. Análisis y control de calidad de la materia prima</i> .....	26
II.2.2.1. Análisis organoléptico .....	26
II.2.2.2. Análisis Físicos - químicos .....	26
II.2.2.2.1. Granulometría .....	26
II.2.2.2.2. Humedad .....	26
II.2.2.2.3. Cenizas totales .....	26
II.2.2.2.4. Contenido de grasa .....	27
II.2.2.2.5. Proteína total .....	27
II.2.2.2.6. Fibra cruda .....	27
II.2.2.2.7. Determinación de glúcidos .....	28
II.2.2.2.8. Contenido de fenoles totales .....	28
II.2.2.2.9. Contenido flavonoides (Quercetina) .....	29
II.2.2.3. Análisis Microbiológicos .....	29
II.2.2.3.1. Mesófilos aerobios .....	29
II.2.2.3.2. Coliformes totales .....	30
II.2.2.3.3. Mohos y levaduras .....	30
<i>II.2.3. Actividad Antioxidante</i> .....	30
II.2.3.1. Modelo Experimental .....	30
II.2.3.1.1. Animales .....	30

II.2.3.1.2. Condiciones ambientales y Conformación de grupos...	31
II.2.3.1.3. Peroxidación lipídica o Lipoperoxidación .....	32
II.2.3.1.4. Obtención del homogenato de mitocondrias y generación de lipoperoxidación microsómica in vitro.....	32
II.2.3.1.5. Metodología para la detección de productos finales de la LP de membranas plasmáticas TBARS .....	32
CAPÍTULO III. RECOLECCIÓN DE DATOS. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	33
III.1. Análisis físico-químicos y microbiológicos de la cascarilla de cacao en polvo (harina).....	33
<i>III.1.1. Análisis físico-químicos</i> .....	33
<i>III.1.2. Propiedades físico-químicas</i> .....	35
<i>III.1.3. Análisis microbiológico</i> .....	37
CAPÍTULO IV. ....	41
CONCLUSIONES.....	41
RECOMENDACIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA.....	43
ANEXOS.....	47
FOTOS DE LA REALIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS FÍSICOS QUÍMICOS .....	52
FOTOS DE LA REALIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS .....	57
FOTOS DE LA REALIZACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Especies reactivas de Oxígeno (ERO)</i> .....	13
<i>Figura 2. Especies que se producen en la peroxidación de lípidos</i> .....	18
<i>Figura 3. Estructura Química del Malondialdehído (MDA)</i> .....	19
<i>Figura 4. Reacción de condensación del ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído</i> .....	20

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla I. Taxonomía del Cacao</i> .....	8
<i>Tabla II. Valores típicos de composición de la cascarilla de cacao (EFSA, 2008)</i> .....	11
<i>Tabla III. Tratamientos utilizados para medir la actividad antioxidante de las cascarillas de cacao en polvo</i> .....	31
<i>Tabla IV. Análisis físico-químicos de las muestras de cascarillas de cacao en polvo</i> .....	33
<i>Tabla V. Contenido de polifenoles de las muestras de cascarilla de cacao en polvo</i> .....	35
<i>Tabla VI. Tratamiento con harina</i> .....	36
<i>Tabla VII. Resultados microbiológicos obtenidos en la harina de la cascarilla de cacao</i> .....	37

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Informe de ensayo de proteína cruda proporcionado por WSS.....	47
Anexo 2. Datos microbiológicos de harina de cascarilla de cacao. Número de u.f.c. encontradas en placas de Petri. ....	48
Anexo 3. Oficio enviado al INSPI para la solicitud de compra de animales de experimentación. ....	49
Anexo 4. Conformación de grupos de animales.....	50
Anexo 5. Dosis de tratamiento con vitamina A.....	50

Anexo 6. Inducción con ácido acetil salicílico.....	50
Anexo 7. Cuantificación de Malondialdehído (MDA) .....	51

### ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de glúcidos.....	35
Gráfico 2. Curva de fenoles totales.....	36
Gráfico 3. Curva de flavonoides.....	37
Gráfico 4. Concentración de MDA/mg de proteína.....	39

## RESUMEN

Durante el estrés oxidativo se alteran biomoléculas como: ADN, proteínas, lípidos (lipoperoxidación), donde se liberan moléculas de malondialdehído producto de la descomposición de endoperóxidos generando enfermedades. Este trabajo se basó en la determinación de la capacidad antioxidante de las cascarillas de cacao sobre la lipoperoxidación en sistemas biológicos utilizando la metodología sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Se realizaron análisis de control de calidad, en la cuantificación de malondialdehído se conformaron 6 grupos con 4 animales, I-control, II-inducción, III- vitamina A, IV.V.VI- 100, 50 y 25 mg/kg de harina, 24 horas antes se administró ácido acetilsalicílico como inductor de lipoperoxidación, se extrajo el hígado se preparó un homogenato que al reaccionar con ácido tiobarbitúrico, se produjo un complejo coloreado determinándose la absorbancia a 535nm. Los resultados microbiológicos determinaron ausencia de microorganismos, en los físico-químicos ausencia de flavonoides y polifenoles 1748 mg de AGE/100g. En dosis de 25, 50,100 mg/kg, la reducción de malondialdehído fue: 0.322, 0.261, 0.418 $\mu$ M respectivamente.

**Palabras claves:** Antioxidante, Endoperóxidos, Homogenato, Lipoperoxidación, Malondialdehído,

## ABSTRACT

Biomolecules such as: DNA, proteins, lipids (lipid peroxidation) are altered during oxidative stress where molecules (malondialdehyde) are released product of the decomposition of endoperoxides creating diseases. This work was based on the determination of the antioxidant capacity of the husks of cocoa on the lipid peroxidation in biological systems using TBARS methodology. Quality control analysis were performed, for the quantification of malondialdehyde, 6 groups with 4 animals were formed, I-control, II-induction, III - vitamin A, IV. V.VI - flour (100, 50 and 25 mg/kg), 24 hours earlier acetylsalicylic acid was administered as lipid peroxidation inducer, livers were extracted, a homogenate was prepared to react with TBA producing a colored complex, determining absorbance at 535 nm. Microbiological results determined absence of microorganisms, physicochemical results determined absence of flavonoids and polyphenols 1748 AGE mg / 100g. In 25, 50, 100 mg/kg dose, the reduction of malondialdehyde was: 0.322, 0.261, 0.418  $\mu$ M respectively.

**Key words:** Antioxidant, Endoperoxides, Homogenate, Lipid Peroxidation, Malondialdehyde

## INTRODUCCIÓN

Según (Mayor, 2015) desde la década de los setenta se ha producido un incremento notable en las áreas de investigación destinadas a los radicales libres y sustancias con capacidad antioxidante. La formación de estos radicales se da por procesos tales como: radiaciones, iones metálicos, drogas; originando el deterioro u oxidación de biomoléculas como ADN, proteínas, lípidos o partes de la célula como la membrana celular. Teniendo un papel en formación de algunas enfermedades degenerativas como: cardiovasculares, aceleración del envejecimiento y en el mayor de los casos cáncer.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015) el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, reportando en el 2014 unos 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer; de los cuales aproximadamente el 30% de estas muertes se deben a factores naturales. En la región de América la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2015) registró en el mismo año unos 2.8 millones de casos nuevos y 1.3 millones de muertes a consecuencia del cáncer, de las cuales el 47% se produjeron en América Latina y el Caribe.

El Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP, 2015) dio a conocer que el cáncer tiene una incidencia creciente, por lo que ocupa la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares. El Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC, 2014) registró 13.092 ingresos hospitalarios. En base a la incidencia se ha realizado una enorme inversión para fortalecer la atención a pacientes con enfermedades oncológicas, implementando consultas y atenciones ambulatorias.

El daño oxidativo de los lípidos se denomina lipoperoxidación (LP), la cual afecta principalmente a los lípidos de las membranas, durante este proceso se generan diversas especies que pueden ser consideradas marcadores del proceso, entre los cuales se encuentra el Malondialdehído (MDA), un aldehído de bajo peso molecular que se forma durante la descomposición de endoperóxidos en las últimas etapas de la LP. (Contesse, 2010)

El malondialdehído es utilizado comúnmente como marcador empleando la metodología de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), esta consiste en la reacción entre el MDA y el TBA en un medio con pH ácido y a

altas temperaturas, donde dos moléculas de TBA reaccionan con una molécula de MDA, formando un complejo coloreado que puede ser medido colorimétricamente a 532 nm.

Gracias al excelente clima tropical y las extensas tierras cultivables que posee el Ecuador, es que ha podido desempeñarse como un país netamente agrícola, siendo el cultivo de cacao una parte representativa de este sector, produciéndose aproximadamente 200.000 toneladas métricas al año ubicándose en la sexta posición entre los países productores de cacao a nivel mundial. De los cuales, el 93.2% se exporta y el 6.8% se destina al consumo nacional según publicación de la Agencia Pública de Noticias del Ecuador y Suramérica (2013)

La cascarilla de cacao ha sido objeto de pocos estudios, algunos de estos demostraron que posee propiedades nutritivas, en la que se destaca una importante actividad antioxidante, y una de las maneras más eficientes de aprovechar estos antioxidantes e incorporarlos a la dieta de las personas es por medio de una infusión. (Soto, 2012). Otra parte de la cáscara se utiliza, como material de combustible para calderas, materia prima para abono y en el mejor de los casos como alimento para pequeños mamíferos, mientras que otra parte es desperdiciada y desechada.

Todo alimento que se emplee para el consumo humano debe pasar por diversas pruebas de inocuidad, con la finalidad de asegurar la obtención de un producto sano, nutritivo y libre de contaminantes. Para que la cascarilla de cacao pueda usarse como materia prima en infusiones debe realizarse una caracterización físico-química, calidad microbiológica y evaluar la presencia de toxinas que predominan en los cultivos de las semillas y granos. (Bhooshany, K., Rizzi, A., 2011)

Teniendo en cuenta, lo expresado anteriormente, el fin de este trabajo fue determinar la actividad antioxidante de la cascarilla de cacao en polvo proporcionada por la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Guayaquil, cuantificando la cantidad de radical malondialdehído producido en la lipoperoxidación en sistemas biológicos, para lo cual se realizó adicionalmente pruebas físico-químicas y microbiológicas que garantizaron la inocuidad del producto, pudiendo ser utilizado en infusiones, suplementos dietéticos etc.

## **PROBLEMA**

### **Justificación**

En los seres humanos existen diversos procesos que se asocian con enfermedades, como Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, diabetes tipo II, cánceres de mama, colon, próstata, enfermedades hepáticas, entre otras. Que entre sus causas o consecuencias forman un desequilibrio a favor de los agentes prooxidantes sobre la célula, que se conoce como estrés oxidativo.

Esto ocurre cuando disminuye la concentración de antioxidantes en el organismo debido a una alteración funcional de las enzimas que están involucradas en la respuesta antioxidante, también el incremento de la producción de agentes prooxidantes generan Especies Reactivas del Oxígeno (ERO).

A pesar de que en Ecuador se encuentran grandes industrias dedicadas a la producción de licor, manteca de cacao y chocolate, no se ha estimulado la manufactura de materias obtenidas en dicha línea de producción sería una estrategia económica dar un valor agregado y comercializar productos a partir de desechos generados en la manufactura del cacao, como es el caso de la cascarilla de cacao.

A pesar de la disponibilidad y bajo costo que presenta la cascarilla de cacao como materia prima, ha sido objeto de pocos estudios en el país. Sin embargo estudios realizados por (Knapp, 1937) han demostrado propiedades nutritivas, en especial una importante actividad antioxidante, que se ha aprovechado a través de infusiones. Sin embargo todo alimento para el consumo humano debe pasar por diferentes pruebas de inocuidad, para asegurar la calidad del mismo.

Calderón y Noriega, de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Guayaquil en el 2017, obtuvieron harinas a partir de residuos industriales alimenticios como, cáscara de plátano, maracuyá y cascarilla de cacao, a las cuales evaluaron el contenido antioxidante que presenta cada una, mediante el método de DPPH, obteniendo valores de 36,93% en la cáscara de plátano, 58,92% cáscara de maracuyá y un 75,97% de DPPH en la cascarilla de

cacao, de acuerdo a los resultados presentados la cascarilla de cacao presenta eficiencia anti radical, siendo una fuente importante de antioxidantes naturales.

Dicha demostración se basó en análisis realizados in vitro, con el fin de tener certeza de la presencia de antioxidantes, en el presente trabajo se emplea la harina de la cascarilla de cacao en animales de experimentación, con el objetivo de demostrar biológicamente la actividad antioxidante que posee la harina.

## **Planteamiento del problema**

Debido a que Ecuador posee un excelente clima tropical y tierras de cultivo fértil es que se ha desempeñado como un país agrícola, de los cuales el cacao representa una gran parte de este sector, produciéndose 200.000 toneladas aproximadas al año. Para esta industria representa un problema el deshacerse de los desechos que generan durante la obtención de chocolate y sus derivados, siendo la cáscara una parte considerable de estos desechos.

Gran parte de la cascarilla se emplea como material de combustible para calderas, materia prima de abono y en el mejor de los casos como alimento para pequeños mamíferos, mientras que otra parte de este es desechada. Ha sido objeto de pocos estudios, por lo que se desconocen los beneficios que pueda brindar y los usos que podrían tener, además de ser empleada como materia prima de infusiones.

## **Formulación del problema**

¿Cuál es el efecto de los compuestos antioxidantes presentes en la cascarilla de cacao frente a radicales libres generados en la lipoperoxidación como el malondialdehído en animales de experimentación?

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Evaluar el efecto de la harina de cacao obtenida de las cascarillas sobre la lipoperoxidación en animales de experimentación.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar las características físico-químicas y microbiológicas de la harina de cacao.
2. Determinar el contenido de fenoles totales y flavonoides totales.

3. Evaluar mediante un modelo experimental el daño oxidativo producidos en la lipoperoxidación sobre las membranas lipídicas inducido por el ácido acetilsalicílico.

### Hipótesis

La harina de cacao obtenida de las cascarillas de las semillas presenta actividad antioxidante al disminuir la concentración de Malondialdehído.

### Análisis de Variables

#### *Variable Dependiente*

- Concentración de malondialdehído (Radical libre)

#### *Variable Independiente*

- Dosis
- Tratamientos

#### *Operacionalización de las Variables*

VARIABLES	CONCEPTUALIZACION	INDICADOR	ÍNDICE
<b>Dependientes</b>	Malondialdehído (radical libre)	El malondialdehído se forma por la peroxidación lipídica de ácidos grasos insaturados y es un marcador de la degradación oxidativa de la membrana celular. (Gómez F. , 2014)	Concentración %
<b>Independientes</b>	Dosis	Es la cantidad de droga expresada generalmente en mg/kg o g/kg de peso corporal, para producir un efecto farmacológico. (Arango, 2012)	Cantidad mg/kg

Tratamiento	Conjunto de medios que se utilizan para prevenir, diagnosticar, tratar o aliviar los síntomas de una enfermedad o un estado anormal. (Gómez, Tratamiento, 2014)	Vitamina A Harina de cacao	(U.I.) mg/ml
-------------	---	-------------------------------	-----------------

---

## CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

### I.1. *Theobroma cacao* Linnaeus

#### I.1.1. Historia

*Theobroma cacao* es el nombre científico que recibe el árbol del cacao o cacaotero, nombre dado por el botánico sueco Carl Linnaeus en 1753 y publicado en el libro *Species Plantarum*. Nativo de México, Centroamérica y el norte de Sudamérica, también ha sido introducido en países tropicales de África y Asia como planta de cultivo según artículo publicado por el Royal Botanic (Gardens, 2012).

El cultivo de cacao ha sido por décadas una de las principales fuentes de ingresos para los agricultores en el Ecuador, por tratarse de un producto de exportación, que sirve como materia prima en la industria nacional para la elaboración de productos derivados. (Armijos, 2002) El cacao nacional, es reconocido internacionalmente por su excelente calidad y aroma floral. En el mercado mundial se distingue entre: granos ordinarios utilizados para la fabricación de chocolates comunes, y los finos o de aroma reconocidos por su marcado aroma y color en la elaboración de chocolates finos, de revestimiento y coberturas de acuerdo a (Rodríguez, 2012).

#### I.1.2. Clasificación taxonómica

En la tabla I que se muestra a continuación se describe la taxonomía del cacao.

*Tabla I. Taxonomía del Cacao*

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Subreino:</b>	Tracheobionta
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Malvales
<b>Familia:</b>	Malvaceae

**Género:** *Theobroma*

---

**Especie:** *T. cacao*

---

**Nombre binomial:** *Theobroma cacao*  
Linnaeus.

**Nombre científico:** *Theobroma cacao* Linnaeus.

**Nombre común:** cacao, árbol de cacao, árbol de chocolate, comida de los dioses.

### ***1.1.3. Descripción morfológica***

Según Braudeau, (1970) el cacao es un árbol espinoso de talla pequeña que alcanza los 5 a 7 m de altura, su altura así como desarrollo depende del medio ambiente en el que se encuentre; en la plantación, las separaciones que se realizan no permiten al cacao desplegar su fronda con la amplitud necesaria para desarrollarse libremente, esto con el fin de formar una cubierta continua encima del suelo y así eliminar toda vegetación adventicia.

Tiene una raíz principal que crece entre 1.20 y 1.50 m, pudiendo alcanzar hasta 8 m dependiendo del suelo, el tallo crece verticalmente a unos 80 a 100 cm de altura aunque haya alcanzado su crecimiento apical este continua creciendo en espesor, las hojas son muy pigmentadas y su color puede variar según los cultivos de color verde pálido más o menos rosado al violeta en el momento de su maduración pierden su pigmentación tomando un color verde oscuro y adquieren rigidez con postura subhorizontal. (Soto, 2012)

La flor es hermafrodita con una longitud de 1 a 3 cm cuando esta se abre comienza el período de viabilidad del polen y si no es fecundada se cae después de tres días de su apertura mediante un estrangulamiento en la zona de abscisión del pedúnculo, el fruto parece una baya presenta un pericarpio carnoso y compuesto por tres partes que son el epicarpio, carnoso y espeso, su longitud varía de 10 a 30 cm y presenta gran variación de forma y color: inmaduros son de color verde y al madurar se oscurecen y pueden presentar trazas de color anaranjado o amarillo. (Chávez, 2015).

#### ***1.1.4. Semilla***

El grano de cacao es una semilla sin albumen, en forma de un haba más o menos gruesa, de 2 a 3 cm de longitud recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco, de sabor azucarado y ácido. Si se sacara la pulpa que rodea la semilla, frotándola, aparece revestida de una envoltura delgada pero resistente de color rosado muy nervada, que proviene del desarrollo de los tegumentos del óvulo, esta envoltura constituye la cascara del haba. (Braudeau, 1970., Armijos, 2002)

Todo el contenido de la semilla, en el interior del tegumento, está prácticamente ocupado por dos cotiledones del embrión, cuyos colores varían de blanco a violeta, pasando por todos los matices intermedios posibles. La longitud puede variar de 20 a 30 mm, la anchura, oscila entre 10 y 17 mm, y el espesor esta entre 7 a 12 mm. (Soto, 2012)

##### ***1.1.4.1 Composición química***

Químicamente la semilla está constituido por: grasa (53.05%), agua (3.65%), nitrógeno total (2.28%), nitrógeno proteico (1.50%), teobromina (1.71%), cafeína (0.085%); carbohidratos: glucosa (0.30%), sacarosa (1.58%), almidón (6.10%), pectinas (2.25%), fibra (2.09%); polifenoles (7.54%); ácidos: acético libre (0.014%), oxálico (0.29%). (EFSA, 2008)

Un 60% de la grasa corresponde a ácidos grasos saturados como el esteárico (34%) y palmítico (28%), también contiene ácidos grasos insaturados como el oleico (35%) que juega un papel importante en la protección vascular, ya que disminuye el colesterol y las LDL, a la vez que aumenta las HDL. Contiene moléculas estimulantes como la teobromina y cafeína, que son alcaloides suaves con capacidad de activar el sistema nervioso, al ser vasodilatadores y por tener propiedades tonificantes, diuréticas y antineurálgicas. (EFSA, 2008)

Los flavonoides se almacenan en los pigmentos de las células de los cotiledones de las semillas de cacao, de los cuales se diferencian tres grupos: las catequinas o flavan-3-oles (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (58%), las catequinas se presentan en trazas de (+) galocatequina y (+) epigalocatequina. (Morales et al, 2012).

### **1.1.5. Cascarilla de cacao**

Luego del descascarillado de la semilla se obtiene la cascarilla, la cual representa un 12% del peso de la semilla, esta tiene características de un material fibroso, seco, crujiente, de color marrón y con un olor similar al chocolate. Cuando es removida, la cascarilla puede contener de 2 a 3 % del grano que no pudo separarse. (EFSA, 2008) (Soto, 2012)

**Tabla II. Valores típicos de composición de la cascarilla de cacao (EFSA, 2008)**

<b>Composición</b>	<b>Valores (%)</b>
Humedad	5,4-15,3
Proteína cruda	6,3-10,4
Fibra cruda	23,4-36,2
Componentes del extracto éter	0,5-2,4
Extracto de nitrógeno libre	31,8-61,4
Cenizas	6,0-10,8

Fuente: (Carrasco, 2015)

En la actualidad la cascarilla de cacao es comúnmente utilizada como material orgánico en la preparación de abono, su composición lo hace ideal para la alimentación de animales rumiantes, pero es limitada debido a su contenido de teobromina, un estimulante encontrado principalmente en las semillas y que se transmite a la cascarilla. (EFSA, 2008)

### **1.2. Antioxidantes**

Según (Zamora, 2007) los antioxidantes son sustancias químicas que se caracterizan por retrasar o impedir la oxidación de diversas sustancias, cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano, en el cual pueden provocar alteraciones fisiológicas importantes que desencadenan diversas enfermedades.

Las propiedades de los antioxidantes no abarcan solamente las interacciones químico-biológicas, sino también la acción en el deterioro oxidativo que afecta a

los alimentos, en la industria alimentaria se emplean adicionándolos a las grasas y otros productos con el fin de retrasar el proceso de oxidación, a la vez que previenen el inicio de la rancidez oxidativa. (Coronado, Vega y Gutiérrez, 2015)

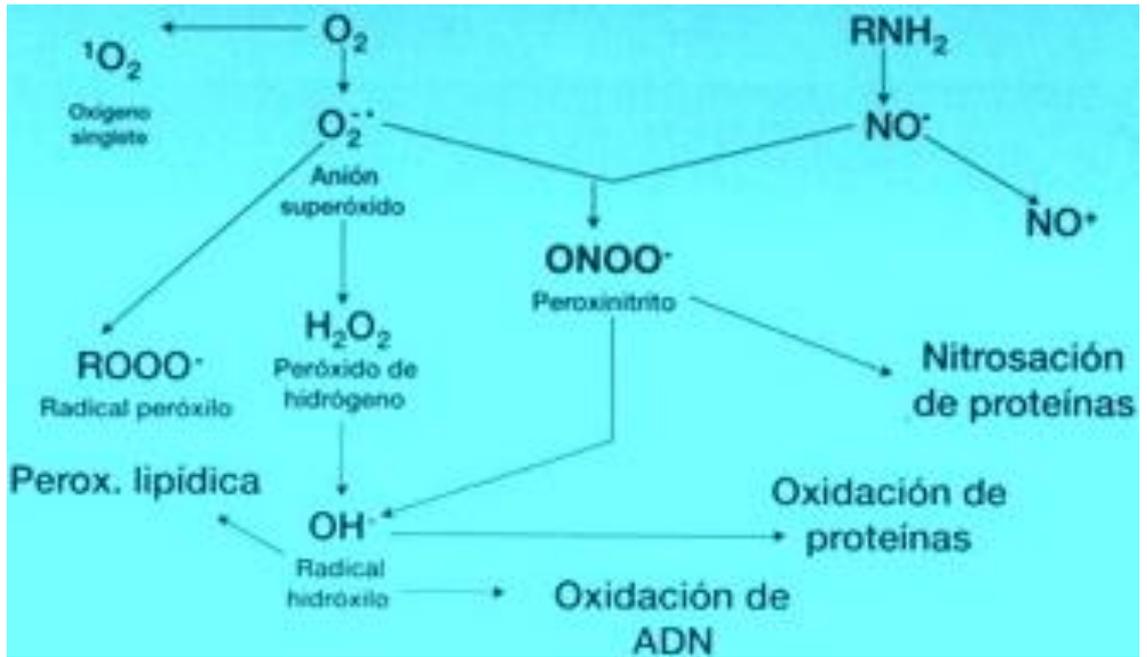
### ***1.2.1. Envejecimiento celular***

El envejecimiento celular es un proceso complejo que ocurre inevitablemente en todos los organismos en los cuales, las células se van haciendo más susceptibles al estrés producido por el medio. En este daño celular participa una gran variedad de moléculas de diferentes orígenes, que incluyen a las especies reactivas derivadas del oxígeno (ERO), debido a que todos los organismos aeróbicos dependen del oxígeno atmosférico. (Contesse, 2010)

### ***1.2.2. Especies Reactivas De Oxígeno (ERO)***

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante en las células que lo utilizan para su metabolismo, es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno, la presencia de factores exógenos como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas, pueden incrementar su nivel. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte de oxígeno con la formación de agua sin la formación de intermediarios tóxicos, mientras que un porcentaje pequeño forma tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son literalmente radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). (Contesse, 2010)

La segunda fuente de ERO también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células defensivas como los polimorfonucleares, monocitos sensibilizados, macrófagos y eosinófilos. Para que puedan cumplir su función, están dotadas de diversas proteínas así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como el peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin último es lesionar y destruir elementos extraños. **(FIGURA 1)**. (Gutiérrez, 2002., Avello y Suwalsky, 2006).



**Figura 1. Especies reactivas de Oxígeno (ERO)**

### **1.2.3. Radicales libres**

Dentro de las ERO se incluyen a los radicales libres, que corresponden a cualquier especie química que posea uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, esta configuración es muy inestable y le otorga al radical la propiedad de ser una especie química altamente agresiva y de una vida media biológica de microsegundos. Esta reactividad lleva a los radicales libres a participar en diversas reacciones de óxido-reducción de biomoléculas, originando así un daño en la célula e incluso la muerte celular. (Avello y Suwalsky, 2006).

Según Gutiérrez, (2002) las principales especies reactivas del oxígeno o sustancias prooxidantes son:

1. Radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ )
2. Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
3. Anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ )
4. Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )
5. Oxígeno nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ )
6. Peróxido ( $\text{ROO}^\bullet$ )
7. Semiquinona ( $\text{Q}^\bullet$ )
8. Ozono

#### ***1.2.4. Estrés oxidativo***

Es un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos o no enzimáticos, debido a la carencia de vitaminas y minerales, procesos inflamatorios, deficiencia del sistema inmune, ejercicios intensos y factores ambientales que impiden que el organismo controle la reacción en cadena de las ERO. Este desbalance interviene en procesos como lipoperoxidación de membranas y orgánulas celulares, en la peroxidación de ácidos nucleicos. (Izquierdo et al, 2009)

#### ***1.2.5. Sistemas de defensa antioxidante celular***

La capacidad antioxidante celular está dada por mecanismos a través de los cuales la célula anula la reactividad o inhibe la generación de radicales libres, comprenden moléculas pequeñas, endógenas y exógenas con capacidad antioxidante. Los exógenos provienen de la dieta, y dentro de este grupo se incluye la vitamina E, vitamina C y carotenoides; la vitamina C constituye el antioxidante hidrosoluble más abundante en sangre, mientras que la vitamina E es el antioxidante lipofílico mayoritario. (Contesse, 2010)

El selenio, actúa junto con la vitamina E como antioxidante, la misma que se encuentra presente en aceites vegetales, aceites de semilla, germen de trigo, maní, carnes, pollo, pescados y algunas verduras y frutas, en tanto que la vitamina C se puede encontrar en frutas y verduras, otros antioxidantes no nutrientes están los compuestos fenólicos cuyas fuentes están en el reino vegetal. (Avello y Suwalsky, 2006).

#### ***1.2.6. Clasificación de los antioxidantes***

Normalmente los organismos aeróbicos poseen mecanismos de defensa que limitan la acción nociva de los radicales libres, este sistema defensivo se denomina, sistema antioxidante (AO), que corresponde a un amplio conjunto de moléculas de distinto origen, que actúan como un sistema coordinado y balanceado que protege a los tejidos y a los fluidos corporales de la acción de ERO producidas fisiológicamente o como respuesta a infecciones o cuadros inflamatorios diversos. (Alvarés, 2013)

Existen diversos criterios para clasificar a los AO, pero los más utilizados son los siguientes:

### *1.2.6.1. Según su mecanismo de protección*

Según Beckman y Ames, (1998) los AO pueden ejercer su acción defensiva a través de tres mecanismos distintos, algunos actúan previniendo la generación de moléculas oxidantes, principalmente a nivel de la cadena transportadora de electrones. Otro grupo, el más importante cuantitativamente, ejerce su acción inactivando o transformando a estas especies reactivas en moléculas menos reactivas, capaces de reaccionar con otros AO generando moléculas químicamente estables.

Finalmente, otros AO son capaces de limitar el efecto nocivo de las moléculas oxidantes, ya que pueden romper o reparar proteínas oxidadas y pueden inactivar lípidos y material nuclear alterado, disminuyendo la propagación del daño. (Contesse, 2010)

### *1.2.6.2. Según su naturaleza química*

#### *1.2.6.2.1. De origen enzimático*

Al tener un origen enzimático, los requerimientos de este tipo de AO son regulados acorde a los requerimientos celulares, pudiendo ser inducidas, inhibidas o activadas por factores endógenos. Actúan catalizando la transferencia de electrones desde un agente reductor (sustrato) hacia los RL, posteriormente los sustratos utilizados se regeneran para quedar nuevamente activos. (Izquierdo Et al, 2009., Hernández,2013). Algunos de estos son:

Superóxido dismutasa: metaloproteína presente en las células aeróbicas y fluidos extracelulares, su función es catalizar la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno. (Contesse, 2010)

Catalasa: hemoproteína que contiene cuatro grupos hemo en su estructura, su función es catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, cuando dicho peróxido se encuentra en altas concentraciones. (Contesse, 2010)

Glutathion peroxidasa: selenoproteína presente en células animales, específicamente en la matriz mitocondrial y citosol, en presencia de la forma reducida del glutathion, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, cuando dicho peróxido se encuentra en bajas concentraciones. Para la acción de estas enzimas se requiere de la participación de cofactores, como

elementos trazas, particularmente el selenio, zinc, cobre y magnesio. (Contesse, 2010)

#### *1.2.6.2.2. De origen no enzimático*

Son un grupo heterogéneo de moléculas que capturan RL y donan un electrón con el fin de estabilizarlo, así originan especies químicas menos nocivas para las células.

Vitamina C o ascorbato: actúa directamente con los radicales superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos, regenera la vitamina E actuando sobre el radical libre tocoferoxilo. (Alvarés, 2013)

Ácido úrico: su acción está basada en su capacidad para prevenir la oxidación de la vitamina C y la formación de complejos con los metales Fe y Cu. (Contesse, 2010)

Glutación: constituye el componente tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células de los mamíferos, también actúa frente a numerosos compuestos oxidantes como: peróxido de hidrógeno, el superóxido, hidroxilo y frente a especies reactivas del carbono. (Avello, M., & Suwalsky, M., 2006)

Flavonoides poli fenólicos: corresponden a un amplio grupo de compuestos fenólicos que actúan como quelantes de metales. (Alvarés, 2013)

Vitamina E: molécula que tiene 8 isómeros estructurales de tocoferol, donde el que tiene mayor poder AO es el  $\alpha$ -tocoferol, su función se basa en la capacidad de capturar radicales superóxidos, hidroxilos y peróxidos lipídicos en membranas celulares y subcelulares deteniendo así la lipoperoxidación de la membrana. (Contesse, 2010)

Vitamina A: protege de la lipoperoxidación producida por el sistema de la xantina oxidasa y elimina el ion superóxido y radicales peróxidos. (Alvarés, 2013)

Coenzima Q: su forma reducida el ubiquinol, impide que los ERO desencadenen la lipoperoxidación de membranas y participa en el reciclaje de la vitamina E. (Contesse, 2010)

### **1.3. Peroxidación Lipídica**

La peroxidación lipídica afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos insaturados, ya que se altera la permeabilidad de la membrana celular

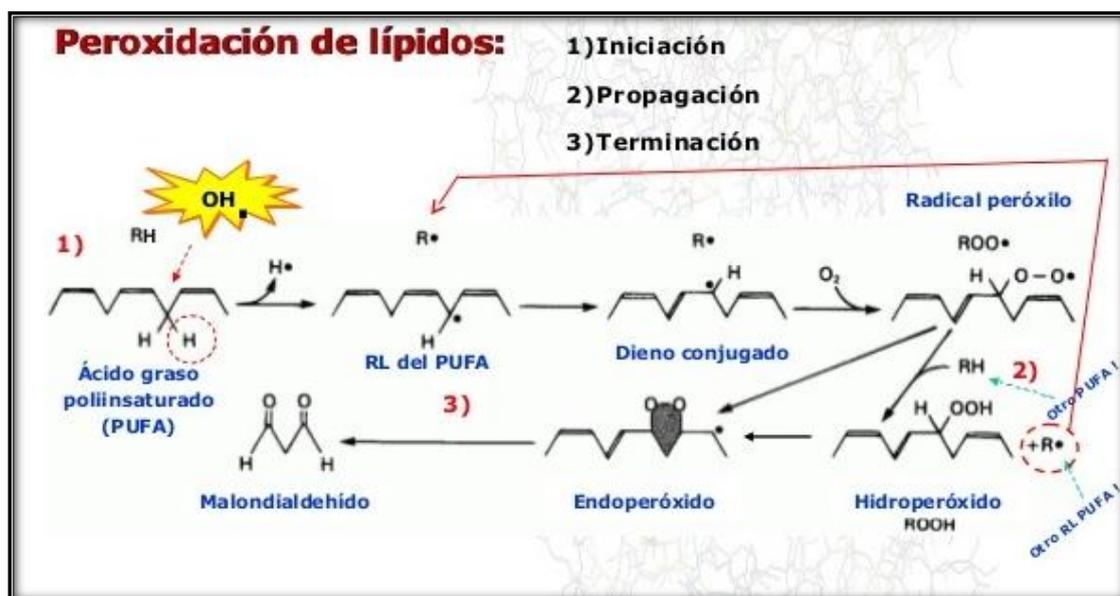
produciéndose edema y muerte celular, se puede dividir como autooxidación propiamente dicha y la catálisis promovida por lipoxigenasas. En muchos alimentos se encuentran en concentraciones muy altas algunas sustancias pro-oxidantes como los metales, las cuales aceleran los procesos degradativos, de tal manera, que no hay un período de inducción. (Gutiérrez, 2002)

La duración del período de inducción y la velocidad de oxidación dependen de la naturaleza del ácido graso oxidable. El período de inducción, es el tiempo en el cual la oxidación del sustrato es constante, y en los ácidos grasos disminuye en el orden oleico, linoléico, linolénico; mientras que la velocidad de oxidación aumenta en el mismo orden; estas variaciones se deben a la capacidad que tienen los compuestos insaturados para formar radicales estables por la presencia de átomos de hidrógeno especialmente activados. (Avello, M., & Suwalsky, M., 2006)

La autooxidación de los lípidos ocurre fundamentalmente debido a los ácidos grasos insaturados a través de una serie de reacciones en cadena de radicales libres, que tiene las fases de iniciación, propagación y terminación. Como la autooxidación de los ácidos grasos insaturados en los alimentos causa disminución en su calidad, para retardarla hay que conocer cada uno de los pasos dentro del proceso. (Contesse, 2010)

En la etapa de iniciación el radical lipídico, R; se forma a partir del lípido (RH), usualmente por el ataque de radicales, luz, calor, irradiaciones o por trazas de metales. El radical lipídico formado reacciona rápidamente con oxígeno para dar un radical peroxilo, ROO; el cual ataca otra molécula de lípido y sustrae un átomo de hidrógeno para formar un hidroperóxido lipídico ROOH, y un nuevo radical lipídico, que inicia de nuevo la secuencia de propagación. (Avello, M., & Suwalsky, M., 2006)

De esta manera, muchas moléculas de lípidos que pueden ser oxidadas hasta hidroperóxidos por muchas formas de iniciación. El ciclo de propagación es interrumpido por las reacciones de terminación, en las cuales hay consumo de los radicales. (FIGURA 2). (Rojano, 1997)



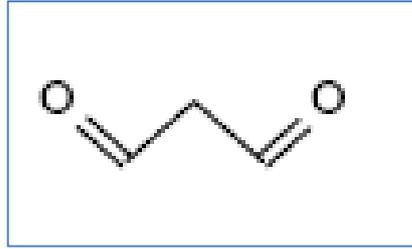
**Figura 2.** Especies que se producen en la peroxidación de lípidos

### ***1.3.1. Productos de la peroxidación lipídica***

#### ***1.3.2.1. Malondialdehído***

El malondialdehído es generado en la peroxidación de los ácidos grasos insaturados y es el principal y más estudiado de los productos de peroxidación lipídica, esto resulta porque durante la peroxidación los ácidos grasos se descomponen en aldehídos como el MDA, altamente tóxico, su vida media y alta reactividad le permiten actuar tanto en el interior como el exterior de células, interactuando con proteínas y ADN, originando diferentes procesos fisiopatológicos. (Avello, M., & Suwalsky, M., 2006)

La interacción con proteínas, como los residuos de lisina en la apolipoproteína B-100, provoca la oxidación de LDL donde se ha visto que su interacción con los macrófagos promueve la arterosclerosis; por otro lado la interacción con el ADN muestra un potencial genotóxico, al generar productos de ADN que originan mutaciones y alteran la expresión génica. (Muñiz Et al, 2014)



**Figura 3. Estructura Química del Malondialdehído (MDA)**

#### *1.3.2.2. Endoperóxido*

Es una enzima precursora de las prostaglandinas, muy inestables de una vida media inferior a los 5 minutos y rápidamente transformada en tromboxano, compuesto todavía más tóxico, estos precursores son responsables de los efectos atribuidos a las prostaglandinas, en particular favorecen la agregación de las plaquetas frente a una lesión del endotelio vascular, trombosis y contracción de la musculatura lisa. (Rojano, 1997)

#### *1.3.2.3. Hidroperóxido*

Son productos muy inestables, derivados de los ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos de la membrana, que se descompone para formar una serie compleja de compuestos, el  $\text{OH}^\bullet$  puede atacar un átomo de hidrogeno metilénico de un ácido graso y formar un radical lipídico, como resultado queda un electrón sin aparear en el átomo del carbono metilénico., este radical sufre un reordenamiento molecular produciendo un dieno conjugado que reacciona con el oxígeno molecular para dar lugar a u radical hidroperoxil lipídico. (Sabán, 2009).

### **1.4. DAÑO OXIDATIVO**

Generalmente la producción de radicales libres están en equilibrio pero debido a numerosas causas se alteran disminuyendo la cantidad de antioxidantes o aumentando las moléculas pro oxidantes generando así el estrés oxidativo y por esta alteración se produce el daño celular, desencadenando una serie de trastornos fisiológicos como por ejemplo oxidar el ADN , los lípidos, las proteínas y carbohidratos celulares. (Chihuailaf et al., 2001).

El daño oxidativo de los lípidos inicia cuando un radical libre se une a un carbono metilénico de una cadena alquilo que, al fragmentarse se transforma en radical libre; afectando la funcionalidad de las membranas celulares y

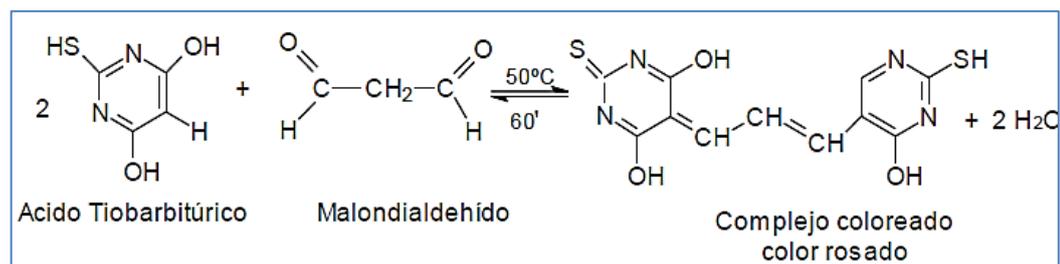
produciendo metabolitos tóxicos como aldehídos como por ejemplo el MDA que al degradarse originarán nuevos radicales libres. (López, Alonso et al., 1997).

El daño oxidativo se puede medir por métodos directos o indirectos.

Método directo: se mide la concentración de agentes oxidantes en una mezcla que se lee por espectrometría de resonancia magnética nuclear pero esta técnica resulta muy difícil debido a la corta vida de las moléculas pro-oxidantes y a los altos valores que tienen los equipos que se necesitan. (Pérez, 2000).

Método indirecto:

Medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA): Esta metodología consiste en la reacción entre el MDA y el TBA, que al estar en un medio con pH ácido y a una alta temperatura, dos moléculas de TBA van a reaccionar con una molécula de MDA, formando un complejo coloreado en una relación de 1:2 MDA: TBA, la que puede ser medido colorimétricamente a 532 nm. (Halliwell y Chirico, 1993).



**Figura 4. Reacción de condensación del ácido tiobarbitúrico y el malondialdehído**

Esta metodología tiene buen resultado si se trabaja en sistemas de membranas aislados como por ejemplo microsomas o liposomas, pero si es aplicado a fluidos biológicos no será muy específico ya que el MDA no es el único aldehído que se produce durante la lipoperoxidación; se tendrá una reacción positiva a la interacción pero no se podrá especificar si sea el complejo que se estaba buscando TBA-MDA. (Halliwell y Chirico, 1993).

Medición de otros aldehídos procedentes de la lipoperoxidación: El 4-hidroxinonenal (4-HNE) es otro de los aldehídos que se producen durante la peroxidación y se puede medir con HPLC, detección UV o cromatografía gaseosa. (Halliwell y Chirico, 1993).

Medición de hidrocarburos volátiles en el aire espirado: principalmente etano y pentano, derivados de los hidroperóxidos de los ácidos grasos insaturados de las series omega-3 y omega-6, no es un método invasivo, pero por lo complicado resulta molesto en los pacientes. (Pérez y Pérez, 2000).

Medición de compuestos fluorescentes de la lipoperoxidación: en este método se mide la lipofuscina, que es un producto final de la destrucción oxidativa de los lípidos pero solo podrá medirse en una etapa tardía de la peroxidación. (Pérez y Pérez, 2000).

## 1.5. GLOSARIO

1. **Antioxidante:** molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas., generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos.
2. **Eppendorf:** empresa líder en el área de las ciencias de la vida que desarrolla y comercializa instrumentos, consumible y servicios para el tratamiento de líquidos, muestras
3. **Estrés oxidativo:** causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad de un sistema biológico de decodificar rápidamente los reactivos intermediarios o reparar el daño resultante.
4. **Factor de hinchamiento:** el fin es determinar la expansividad o aumento de volumen de una muestra de suelo cohesivo.
5. **Isoforma:** una de las distintas formas de la misma proteína, estas podrían ser generadas por genes relacionados, o podrían generarse a través del proceso de maduración diferencial.
6. **Lipoperoxidacion:** degradación oxidativa de los lípidos, proceso por el cual los radicales libres capturan electrones de los lípidos en las membranas celulares.
7. **Polifenoles:** grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula, subdivididos generalmente en taninos hidrolizables y fenilpropanoides.
8. **Solubilidad:** corresponde a la máxima cantidad de soluto que se puede disolver en una cantidad determinada de disolvente a determinadas condiciones de temperatura y presión.

- 9. Tocoferol:** varios compuestos orgánicos conformados por varios fenoles metilados, que forman una clase de compuestos químicos llamados tocoferoles de los cuales varios actúan como vitamina E.
- 10. Tubos Eppendorf.** Es un pequeño contenedor cilíndrico de plástico con fondo cónico, fabricados de polipropileno y pueden emplearse a temperaturas muy bajas de  $-20^{\circ}\text{C}$  o con disolvente orgánicos como el cloroformo, su tamaño oscila entre los 200  $\mu\text{l}$  y los 2ml y la capacidad comúnmente usada es de 1,5ml.

## **CAPÍTULO II. METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION**

### **II.1. Métodos científicos empleados en la Investigación**

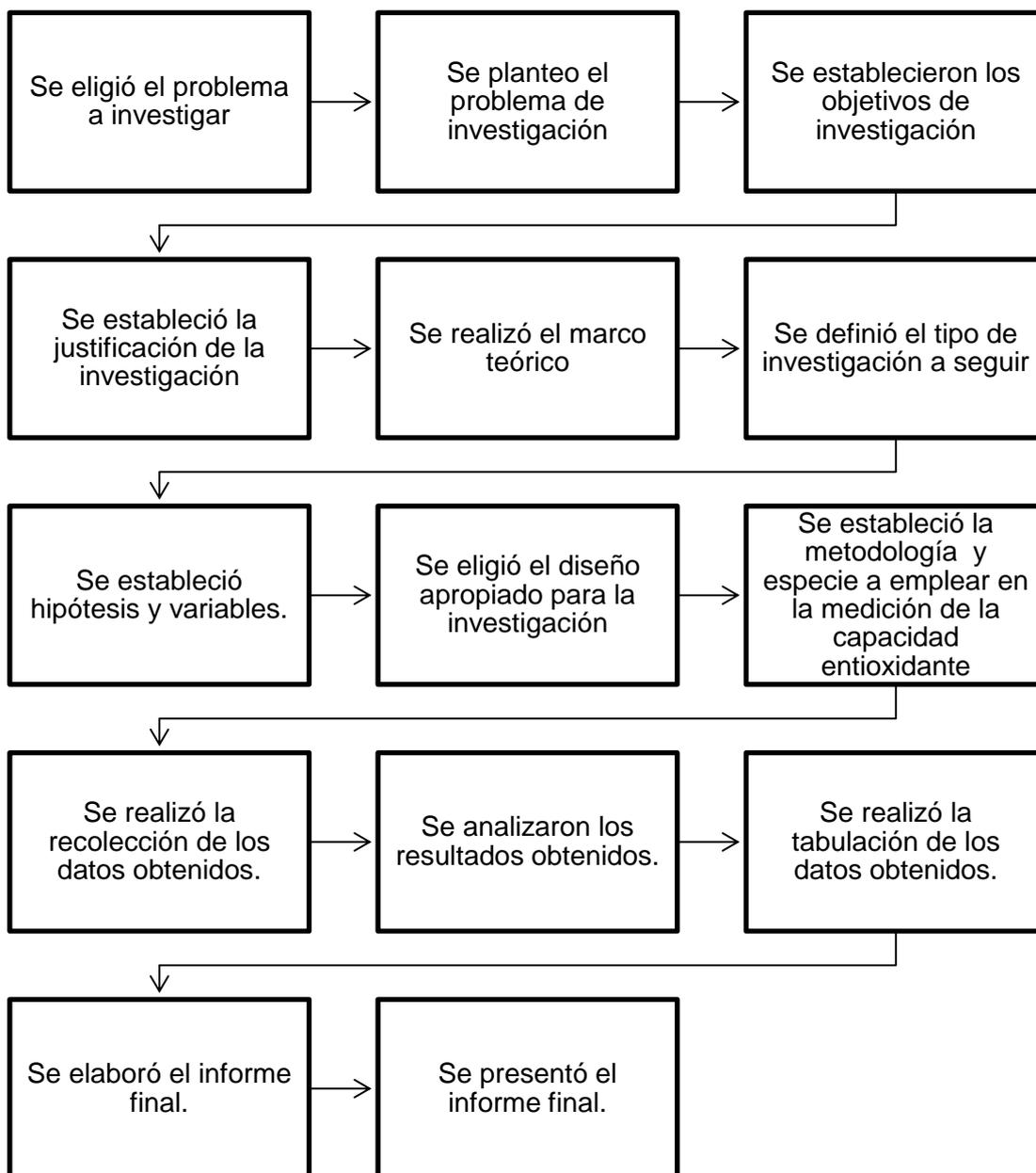
Se emplearon métodos teóricos, como el hipotético-deductivo ya que se planteó la hipótesis de la harina obtenida de las cascarillas de cacao tiene actividad antioxidante, para lo cual se determinó la cantidad de malondialdehído, producto final de la lipoperoxidación que reacciona con el ácido tiobarbitúrico.

Métodos empíricos como el observacional-experimental, porque se determinó la capacidad antioxidante de la harina obtenida de las cascarillas de cacao en la lipoperoxidación utilizando hígados de ratones, administrando diferentes tratamientos con diferentes dosis, con el fin de establecer la dosis terapéutica máxima.

Se aplicaron métodos estadísticos descriptivos como media y desviación estándar, con el fin de controlar la dispersión de los resultados que se obtenían, además se empleó una curva de distribución relacionando las absorbancia obtenidas de la actividad del malondialdehído con las concentraciones de harina que se emplearon. El Tipo de investigación del presente trabajo correspondió un estudio correlacional debido a que se midieron variables: dependientes como la concentración de malondialdehído, e independientes como la dosis y tratamientos.

El modelo experimental que se siguió fue el planteado por (Soto, 2012), el cual permitió establecer la comparación entre grupos controles a los que se le indujo la lipoperoxidación con la administración de ácido acetilsalicílico y otro sin tratamiento alguno; frente a grupos experimentales a los cuales se les administró vitaminas A y C, y diferentes dosis de harina obtenida de las cascarillas de cacao, sin haberse realizado pruebas previas.

## II.2. Metodología



### II.2.1. Obtención de la Materia Prima

Para los ensayos de caracterización de la materia prima (harina de cacao) se utilizaron muestras de cascarilla de Cacao en polvo proporcionadas por la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad de Guayaquil, la misma que forma parte del trabajo de titulación. Cuyos autores son Calderón Yagual Verónica y Noriega Rubio Viviana (Obtención de harina de los residuos de frutas con mayor poder antioxidante y antimicrobiano; maracuyá, cacao y plátano).

Las muestras se prepararon a través de una molienda hasta un tamaño de partícula menor al diámetro del tamiz 315 nm, manteniéndose almacenadas en envases al vacío durante la realización de los análisis, para evitar posibles cambios en la composición.

## ***II.2.2. Análisis y control de calidad de la materia prima***

### *II.2.2.1. Análisis organoléptico*

Se realizó un análisis sensorial al polvo obtenido de las cascarillas de las semillas de cacao, donde se observó, un color marrón, sabor y olor característicos a cacao, en base a la NORMA (INEN 0620, 1989)

### *II.2.2.2. Análisis Físicos - químicos*

#### *II.2.2.2.1. Granulometría*

Para la determinación del tamaño de partícula del polvo obtenido de las cascarillas de cacao se procedió a seguir la metodología planteada en la norma INEN 0517, (2003), donde se pesó 100 g de la muestra en una balanza precisa Shimadzu Aux 220, luego se transfirió la muestra a una columna de tamices de diferentes tamaños (45, 70, 80  $\mu\text{m}$ ), donde el tamiz de mayor abertura se colocó en parte superior y el de menor quedo en el fondo, se agito durante cinco minutos, después de esto se desintegraron los aglomerados y en función del peso de la muestra retenida en cada tamiz se calculó el tamaño de partícula.

#### *II.2.2.2.2. Humedad*

Para la determinación de humedad en la cascarilla de cacao se empleó el método que describe la Norma COVENIN 1575-80, (2006) donde se procedió a pesar 3.00g de la muestra y colocados en una estufa al vacío en condiciones de 25 mmHg y 105°C, por 2 horas hasta alcanzar un peso constante. El porcentaje de humedad se calculó a partir de las diferencias de peso entre la muestra inicial y la deshidratada.

$$\% \text{ Humedad} = \left( \frac{\text{crisol vacío} - \text{crisol con muestra}}{\text{total sin humedad}} \right) \times 100$$

#### *II.2.2.2.3. Cenizas totales*

La cantidad de cenizas totales se determinó usando la norma INEN 0520, (2013), primero se calentaron los crisoles vacíos en la mufla a 600°C, durante 30

minutos, posterior se enfriaron en el desecador y se procedió a pesar 3g de muestra, luego se colocaron los crisoles con el contenido en la mufla a 600°C por 3 horas, o hasta obtener cenizas de un color gris. El contenido de ceniza se calculó a partir de las diferencias de peso entre la muestra inicial y la muestra final.

$$\% \text{ Cenizas} = \left( \frac{\text{crisol con ceniza} - \text{crisol vacío}}{\text{crisol con muestra} - \text{crisol vacío}} \right) \times 100$$

#### *II.2.2.2.4. Contenido de grasa*

Para la extracción de grasa de la muestra se realizó una hidrólisis utilizando hexano, para lo cual se pesaron 3,50g de la muestra en tubos Eppendorf, se le añadió 20 ml de hexano y se agitó en Vortex de 1 a 2 minutos, se llevó a baño maría por 5 minutos a 40°C, luego se procede a centrifugar. Se separó el líquido sobrenadante en una fiola previamente tarada; se evaporó el hexano (hasta sequedad) en una estufa por 1 hora a 60°C, se enfrió y por gravimetría se calculó el contenido de grasa.

$$\% \text{ Grasas} = \left( \frac{\text{fiola con grasa} - \text{fiola vacía}}{\text{peso de la muestra (g)}} \right) \times 100$$

#### *II.2.2.2.5. Proteína total*

Esta prueba se la realizó en el Laboratorio WSS, donde se empleó la metodología descrita en la norma INEN 0465, (2009), la cual determina el contenido de fibra bruta mediante el método de Kjeldahl.

#### *II.2.2.2.6. Fibra cruda*

Para el análisis del contenido de fibra cruda se pesaron 2,5 g de muestra y se colocó en una fiola de 500 ml, se agregó 150 ml de ácido sulfúrico al 1,5% y llevado a un reflujo a 400°C durante 30 minutos a partir de ebullición, se sacaron y dejaron enfriar. Luego se traspasó el contenido en tubos Eppendorf y se procedió a lavar de 4 a 5 veces con agua destilada mediante centrifugación. Se transfirió el precipitado a una fiola y agregó 150 ml de hidróxido de sodio al 1,25%, se calentó a 370°C durante 30 minutos a partir de ebullición.

Posteriormente se sacó y filtró enseguida en papel filtro lavando 4 veces con agua destilada, 3 veces con alcohol y un poco de éter. Se separó del papel filtro lo que quedó de la muestra y transfirió a una caja Petri verificando que no quede nada en el papel para evitar pérdida de muestra. Se llevó a la estufa a 100°C

por 1 hora hasta que pierda humedad. La pérdida de peso después de la calcinación representa el contenido de fibra cruda.

$$\% \text{ Fibra cruda} = \left( \frac{\text{residuo seco} - \text{valor ceniza}}{\text{peso de la muestra (g)}} \right) \times 100$$

#### *II.2.2.2.7. Determinación de glúcidos*

Mediante el método fenol-ácido sulfúrico, para lo cual se procedió a pesar 0.200g de muestra en un matraz con 50ml de etanol, se llevó a reflujo por 1 hora, luego se filtró y lavó con 20ml de etanol caliente y se llevó a otro reflujo durante 2 horas con agua caliente, se filtró y se transfirió el contenido a un matraz volumétrico de 250ml realizando 2 lavados con agua caliente y se enrasó.

Posteriormente se tomó una alícuota de 0.4 ml de la solución anterior, 1ml de agua destilada, 1ml de fenol al 5%, 4ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se dejó en reposo durante 10 minutos, luego se llevó a baño maría a 40°C durante 15 minutos, se dejó enfriar y se leyó en el espectro a una absorbancia de 490nm. Se realizó a la vez una curva de calibración de una solución de glucosa al 0.08 mg/ml. (Cristancho y Monroy, 2012)

#### *II.2.2.2.8. Contenido de fenoles totales*

Para la cuantificación de fenoles totales en la harina de cascarillas de cacao se utilizó el método de Folin-Ciocalteu de García, E., Fernández, I, (2015) donde se prepararon los extractos a partir de cada muestra, para lo cual se pesan 500mg de muestra recién molida y se le realizan dos extracciones sucesivas de una hora con metanol-agua 80:20 v/v acidificando con HCl al 1% a temperatura ambiente, se transfirió el contenido a tubos Eppendorf, se homogenizo en Vortex y se centrifugo a 10000rpm durante 15 minutos.

La curva de calibración se construyó a partir de una disolución madre de ácido gálico de 100mg/L, a partir de esta disolución se prepararon 10 ml de disoluciones diluidas de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 0 y 16 ppm. Se tomaron 250 µl de cada disolución de ácido gálico y sobrenadante procedente de la extracción en matraces aforados de 25ml, se añadieron 15ml de agua destilada y 1.25ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, se homogenizo el contenido de los matraces y dejó en reposo durante 8 minutos en oscuridad.

Transcurrido este tiempo se adiciono a cada matraz 3.75ml de una disolución de carbonato sódico al 7.5% y se llevó a volumen con agua destilada, se homogenizo y deajo en reposo durante dos horas a temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 6 Thermo Scientific a una longitud de onda 765 nm. Adicionalmente se preparó un blanco de reactivos. Los resultados de este ensayo se expresaron en mg AGE (Ácido Gálico Equivalente)/100g de muestra.

$$\frac{\text{mg ácido gálico}}{100 \text{ ml solución}} = \frac{\text{concentración mg}}{100 \text{ ml}} \times \frac{10 \text{ ml disolvente}}{\text{g de muestra}} \times 100$$

#### *II.2.2.2.9. Contenido flavonoides (Quercetina)*

Para determinación de flavonoides se pesó 0.500 g de muestra en tubos Eppendorf y se agregaron 25 ml de etanol al 80%, se centrifugo a 10000rpm durante 15 minutos, posterior a esto se tomó una alícuota de 0.4 ml del sobrenadante y se transfirió a un matraz de 10 ml, se le agregaron 200µl de acetato de potasio 1M más 200µl de nitrato de aluminio al 10%, se llevó a volumen con etanol 80%, se dejó reposar durante 40 minutos y se procedió a leer en un espectrofotómetro UV-Visible Genesys 6 Thermo Scientific a 415 nm.

#### *II.2.2.3. Análisis Microbiológicos*

En el análisis microbiológico de la harina obtenida de las cascarillas de cacao se llevó a cabo el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, coliformes totales y mohos y levaduras.

##### *II.2.2.3.1. Mesófilos aerobios*

Para la realización de este ensayo se empleó el método para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de Petri según la norma COVENIN, (1987), la cual consiste en la siembra en profundidad en un medio de cultivo Plate Count Agar (de Laboratorio Cevallos) vertidos en placas de Petri, con 1 ml de dilución a concentraciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . Luego se dejó en incubación por 48 horas a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, se procedió a contar las colonias obtenidas en las placas de Petri y se calculó el número de microorganismos por gramo de muestra.

#### *II.2.2.3.2. Coliformes totales*

Para realizar esta prueba se desarrolló el método para el recuento de bacterias coliformes en placas de Petri según la norma COVENIN, (1984) en la cual se realizó la siembra en profundidad de 1ml de dilución a concentraciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , en un medio de Agar violeta rojo bilis en una placa de Petri. La incubación de las placas se realizó a 37°C por 48 horas. Luego de haber transcurrido este tiempo se contaron las colonias formadas.

#### *II.2.2.3.3. Mohos y levaduras*

Para esta prueba se siguió la metodología para recuento de mohos y levaduras descrita en la norma COVENIN, (1990), que se basa en la siembra en superficie en un medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) repartidos en placas de Petri. Para la siembra se utilizaron 100ul de diluciones a  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ . La incubación de las placas se realizó a condiciones de 25°C durante 5 días. A partir del número de colonias obtenidas se calculó el número de levaduras y mohos por gramo de muestra.

### **II.2.3. Actividad Antioxidante**

#### *II.2.3.1. Modelo Experimental*

La presente investigación se llevó a cabo en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Guayaquil. El método a seguir es el que se encuentra referido por (Janero, 1990; Halliwell y Chirico, 1993; Armstrong y Browne, 1995) “metodología TBARS, la cual consiste en la reacción entre el MDA y el TBA, en un pH ácido y a altas temperaturas, donde dos moléculas de TBA reaccionan con una molécula de MDA, formando un complejo coloreado que es medido espectrofotométricamente a 532nm.

##### *II.2.3.1.1. Animales*

Se utilizaron ratones machos CD-1 con un buen estado de salud en general, entre 8 a 10 semanas de nacidos con un peso promedio de 30g, los cuales fueron proporcionados por el Instituto Nacional De Investigación en Salud Pública (INSPI) ver anexo 5, y trasladados al Bioterio de la Facultad.

### II.2.3.1.2. Condiciones ambientales y Conformación de grupos

Los animales fueron sometidos a un periodo de climatización por varios días con las siguientes condiciones ambientales: temperatura de 23-25 °C y humedad de 30- 70%, se los mantuvo en jaulas plásticas con tapa metálica y acceso libre a agua y comida. Para una mejor observación dentro de los grupos, los animales fueron identificados con una marca única en el rabo.

Se los organizó en seis grupos de cuatro animales, previamente pesados en una (balanza Shimadzu AUX 220), para la administración de los diferentes tratamientos en base a la dosis correspondiente de acuerdo al peso. (Ver tabla III)

**Tabla III. Tratamientos utilizados para medir la actividad antioxidante de las cascarillas de cacao en polvo**

Grupos		Inducción	Tratamientos
I	Control	Homogenato	_____
II	Inducción de la lipoperoxidación	Homogenato + ácido acetil salicílico	-----
III	Control positivo	Homogenato + ácido acetil salicílico	Vitamina A
IV	Harina 1	Homogenato + ácido acetil salicílico	120 µl
V	Harina 2	Homogenato + ácido acetil salicílico	60 µl
VI	Harina 3	Homogenato + ácido acetil salicílico	30 µl

#### *II.2.3.1.3. Peroxidación lipídica o Lipoperoxidación*

Para la realización de este ensayo se realizaron modificaciones a los modelos descritos por (Halliwell y Chirico, 1993; Mercuse y Jhoasnsso, 1997), donde a los animales se les administró por vía oral los diferentes tratamientos (los polifenoles presentes en la harina se concentraron a través de una evaporación etanólica) y ácido acetil salicílico (inductor de la lipoperoxidación) 3 días previos al ensayo final. Transcurrido este tiempo se administró nuevamente los tratamientos y después de una hora se procedió a dar eutanasia a los animales para la extracción del hígado, estos requirieron ayuna entre 4-6 horas previas.

#### *II.2.3.1.4. Obtención del homogenato de mitocondrias y generación de lipoperoxidación microsómica in vitro*

Después de realizar la eutanasia a los animales, se extrajeron los hígados de cada uno de los animales y se lavaron con NaCl al 0.9% en un baño de hielo a 4°C durante 10 minutos, luego se procedió a triturar los hígados y pesar 1g de tejido en tubos de centrifuga con 9ml de KCl al 1.15%, se homogenizo y centrifugo a 6000rpm durante 30 minutos. Se descartó líquido sobrenadante y se pesó 0.1mg del sedimento en tubos de centrifuga y se adicionó 2.4ml del amortiguador fosfato de potasio 50mM a un pH de 7.4, 150 µl de cloruro férrico 600µM y 150ml de ascorbato de sodio 1mM.

Posteriormente, la mezcla se incubó durante 30 minutos en un baño termostático con agitación constante, la reacción se detuvo mediante la precipitación de las proteínas al agregar 1500 µl de ácido tricloroacético 20% P/V en baño de frío a 4°C, la mezcla se centrifugo a 15000rpm durante 10 minutos.

#### *II.2.3.1.5. Metodología para la detección de productos finales de la LP de membranas plasmáticas TBARS*

Se tomaron 1200µl de la fracción enriquecida (líquido sobrenadante) y se agregó 1500µl de ácido tiobarbitúrico al 1%P/V, la mezcla se homogenizo e incubo en un baño termostático a 50°C durante 60 minutos con agitación constante. El complejo formado por MDA y TBA produjo una reacción colorimétrica de color rosa a la que se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro UV/Vis A 535NM. (Contesse B. , 2010)

## CAPÍTULO III. RECOLECCIÓN DE DATOS. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

### III.1. Análisis físico-químicos y microbiológicos de la cascarilla de cacao en polvo (harina)

#### III.1.1. Análisis físico-químicos

En la tabla IV. Se presentan los resultados obtenidos de los análisis físico-químicos realizados a la harina de las cascarillas de cacao, con el promedio y desviación estándar de los triplicados.

**Tabla IV. Análisis físico-químicos de las muestras de cascarillas de cacao en polvo.**

<b>Muestras</b>	<b>Humedad (g/100g)</b>	<b>Ceniza (g/100g)</b>	<b>Grasa (g/100g)</b>	<b>Fibra (g/100g)</b>	<b>Proteína (g/100g)</b>	<b>Glúcidos (mg/100g)</b>
1	4.845	8.75	2.26	17.27	14.83	67.18
2	4.782	8.85	2.25	18.45		77.65
3	4.659	9.08	2.22	18.63		71.03
Promedio	4.762	8.89	2.24	17.86	14.83	71.95
Desviación estándar	± 0.07	± 0.14	± 0.005	± 0.59	_____	± 4.32
Valores referenciales	5.4-15.3	6.0-10.8	1.38 ± 0.55	23.4-36.2	6.3-10.4	_____

(Los valores referenciales son reflejados en la EFSA, 2008)

Se observa que el contenido de humedad de la cascarilla están en un promedio de 4.76%, valores similares a los reportados por (Soto, 2012) y

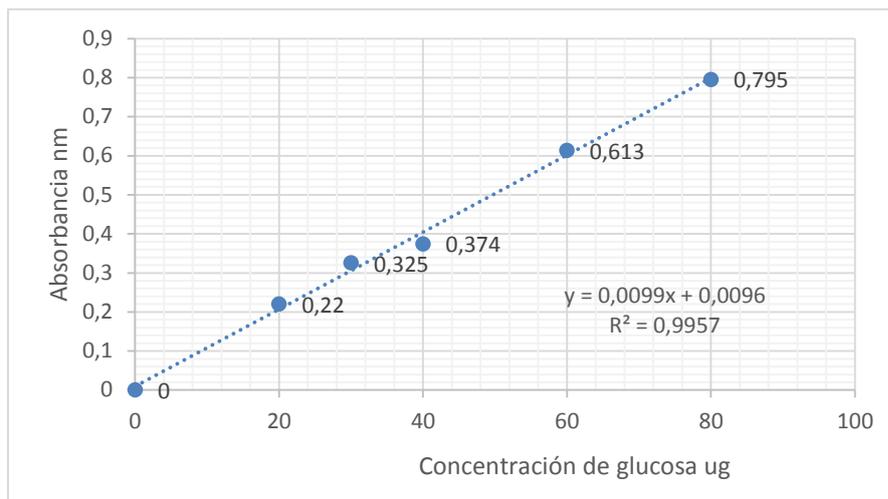
menores a los que indican (Calderon y Noriega, 2017) y la referencia (EFSA, 2008), esta variable está afectada por el proceso térmico previo al descascarillado y por el secado de la harina, por lo que hubo una pérdida de agua previo al análisis.

El contenido de cenizas totales esta entre un 8-9% valores mucho mayores a los que reportan (Calderon y Noriega, 2017) pero concuerda con los reportados por (Soto, 2012) y están dentro de los valores referenciados por la EFSA, 2008, la cuantificación de cenizas además de poseer interés nutricional, como factor de control de calidad en cuanto a contaminación e impurezas se puedan presentar en la materia prima y es un parámetro de importancia en la elaboración de infusiones restringido por la norma COVENIN 1980 de infusiones, que permite un máximo del 10%, por lo tanto la harina obtenida de las cascarillas de cacao cumple con este requisito.

El contenido de grasas encontrado fue de un 2,22-2,26%, estudios previos realizados a la cascarilla de cacao presenta un bajo contenido de lípidos alrededor de 1 al 6% según (Knap y Coward, 1935; Lecumberri *et al.*, 2006) lo que se pudo corroborar con los resultados obtenidos, similares a los reportados por (Soto, 2012).

El contenido de fibra cruda varía entre un 17-18% valores superiores a los reportados por (Calderon y Noriega, 2017) y por debajo de los valores referenciados en la EFSA, 2008, esto depende de las condiciones en la se obtuvo la materia prima, o también puede ser porque en el proceso de análisis se va perdiendo cierta cantidad de contenido en las centrifugadas o filtradas.

El contenido de proteína está en un 14,83%, valores por encima de los reportados por la EFSA, 2008 y menor al obtenido por (Soto, 2012) que están entre 18-19%. El contenido de glúcidos esta entre un 67-77%, los estudios de (Lecumberri, 2006; Cardona *et al.*, 2002) reporta valores cercanos al 70%, lo que se asemeja a los encontrados en la muestra de cascarilla de cacao. (Véase gráfico 1)



**Gráfico 1. Curva de glúcidos**

Es importante recordar que las muestras de cascarillas de cacao (harina) analizadas fueron procesadas y proporcionadas por la Facultad de Ingeniería Química, cuyo origen son centrales agrícolas del Cantón Naranjal, lo que incluye un gran número de variables que pueden afectar la cuantificación del contenido proximal de la muestra y provocar diferencias en los resultados de los mismos, condiciones de cultivo, tiempo de secado, tiempo de almacenaje, condiciones de procesamiento de la materia prima.

### III.1.2. Propiedades físico-químicas

**Tabla V. Contenido de polifenoles de las muestras de cascarilla de cacao en polvo**

Muestras	Fenoles T. (mg AGE/100g)
1	1607
2	1663
3	1976

---

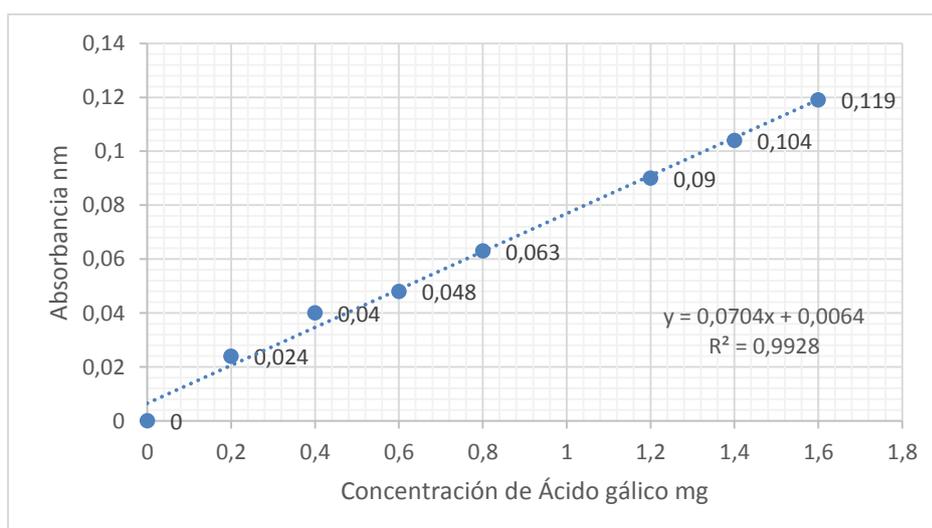
Promedio 1748

---

Los valores de fenoles son mayores en la muestra 3, en datos reportados por Lecumberri, (2006), el contenido de polifenoles en la cascarilla de cacao presenta valores cercanos a los 6000mg/100g de muestra, al compararlos con los obtenidos en el ensayo, estos últimos están significativamente por debajo de los reportados. Esta variación en los valores puede deberse a distintas causas como las condiciones de procesamiento de la materia prima, condiciones de almacenaje, etc.

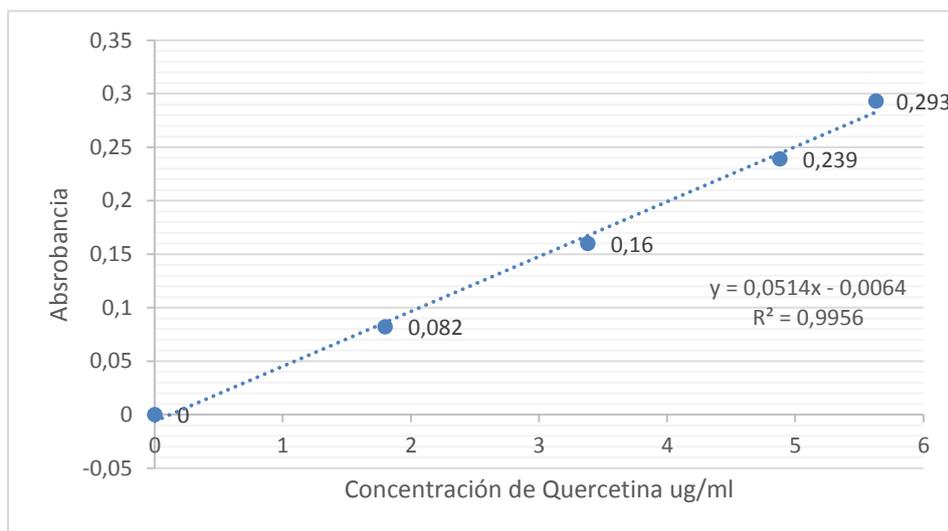
**Tabla VI. Tratamiento con harina**

N	Dosis harina 100mg/Kg	Contenido Polifenoles 0,875 mg/g harina	Dosis harina 50mg/Kg	Contenido Polifenoles 0,875 mg/g harina	Dosis harina 25mg/Kg	Contenido Polifenoles 0,875 mg/g harina
1	3,7	4,229	1,795	2,051	0,9925	1,134
2	4,16	4,754	1,88	2,149	0,9475	1,083
3	3,9	4,457	1,905	2,177	0,8775	1,003
4	3,48	3,977	1,98	2,263	1,01	1,154



**Gráfico 2. Curva de fenoles totales**

En cuanto al contenido de flavonoides, estos presentaron absorbancias inferiores que no entraban en la curva de calibración, por lo que se deduce que el contenido es mínimo o nulo.



**Gráfico 3. Curva de flavonoides**

### III.1.3. Análisis microbiológico

En la tabla VI. Se muestran los resultados de las determinaciones de mesófilos aerobios, coliformes totales, mohos y levaduras en la harina obtenida de las cascarillas de cacao. Solo se observa la presencia de aerobios mesófilos en las muestras, ya que estos microorganismos se encuentran en los alimentos de manera extensa debido a que las condiciones para su desarrollo con proporcionadas por el medio ambiente fácilmente.

**Tabla VII. Resultados microbiológicos obtenidos en la harina de la cascarilla de cacao**

Microorganismo	Diluciones realizadas			
	1:10	1:100	1:1000	1:10000
Aerobios mesófilos (u.f.c./g)	19 x 10 <sup>1</sup>	10 x 10 <sup>1</sup>	2 x 10 <sup>1</sup>	1 x 10 <sup>1</sup>

Coliformes totales (u.f.c./g)	< 10	< 10	< 10	<10
Mohos (u.f.c./g)	1 x 10 <sup>1</sup>	< 10	< 10	<10
Levaduras (u.f.c./g)	< 10	< 10	<10	< 10

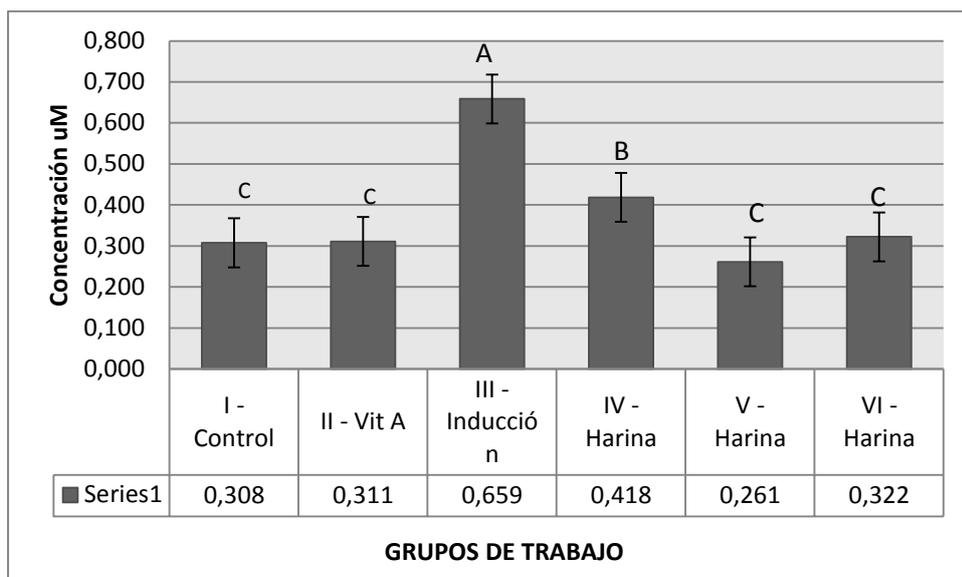
Este tipo de análisis sirve para monitorear la implementación de buenas prácticas de manufactura BPM, la eficiencia de los procesos aplicados, condiciones de higiene del equipo y utensilios, condiciones de almacenamiento y distribución.

En base a la normativa (INEN 0620, 1989) que establece los requisitos microbiológicos que debe cumplir el cacao en polvo para consumo humano, los resultados obtenidos están dentro de los valores permitidos por la norma INEN, si el fin de la harina es para materia prima de infusiones, estos deben cumplir con los criterios mostrados por la EFSA en el Anexo, 4, los resultados obtenidos en las primeras diluciones muestra una diferencia de 50 u.f.c. por encima de lo establecido para la cascarilla de cacao.

Sin embargo, estos microorganismos en general no provocan enfermedades en el ser humano y su presencia no causa un deterioro significativo en los alimentos, si se lleva a cabo en condiciones y tiempo de almacenaje adecuado. Por estas razones no es necesaria la aplicación de algún proceso que disminuya la presencia de estos microorganismos en la harina de cascarilla de cacao para consumo humano.

### **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

La concentración de malondialdehído se determinó a partir de la reacción con el TBARS formando un complejo coloreado que se determinó espectrofotométricamente a 535 nm, dichas concentraciones se reflejan en el Gráfico I.



**Gráfico 4. Concentración de MDA/mg de proteína**

Letras iguales en columna no presentan diferencia significativa

En relación a las concentraciones obtenidas se puede establecer, luego del análisis estadístico (ANOVA), los grupos IV y V que recibieron la dosis de 25, y 50 mg/kg, guardan relación con el grupo normal (no tratado) y el control positivo (Vitamina A), pero difieren del grupo inducido AAS (sin tratamiento).

La dosis de 25mg/kg es la que presentó mayor respuesta en comparación a las demás, según estudios realizados en ratas (Gómez, 2015), indican que los diferentes grupos de polifenoles difieren en estructura polimérica, confiriéndoles un alto peso molecular, el cual limita su absorción en el intestino, una vez absorbidos están sujetos a procesos de detoxificación metabólica, que incluyen modificaciones como metilación, sulfatación y glucuronidación. Las concentraciones de polifenoles en el plasma son muy variables y es necesario ingerirlos reiteradamente para mantener concentraciones elevadas de polifenoles en el plasma.

Estos procesos aumentan la hidrofiliidad del compuesto y facilitan de esa manera la excreción por vía urinaria o biliar. Las frecuencias de estas modificaciones están condicionadas por la naturaleza y la dosis de polifenoles ingeridos. La actividad antioxidante y prooxidantes de los polifenoles está condicionada en base a su estructura y concentración que se encuentren, siendo que a dosis bajas proporcionan efectos beneficiosos y dosis altas puedan causar

daño a nivel celular, en este caso aumentando los niveles de malondialdehído. Esta es la razón por la que la dosis de 25 mg/kg presentó mejor respuesta frente a la dosis de 100mg/kg.

En cuanto a la carga antioxidante reportada por (Calderon y Noriega, 2017) a una concentración de 100  $\mu$ l, la harina de cacao es la que presentó mayor carga antioxidante con un 75,96 en comparación a la de maracuyá (58,92) y plátano (36,92). Afirmando los resultados obtenidos en la presente investigación.

## CAPÍTULO IV.

### CONCLUSIONES

1. Se determinó las características físicas químicas de la harina de cacao en lo que se obtuvo un promedio de porcentaje de: humedad 4.762, ceniza, 8.89, grasa 2,24 g/100g, los mismos que están dentro de los rangos de análisis físicos químicos de las muestras de cascarilla de cacao en polvo según la tabla EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria). Por otro lado en los análisis microbiológicos los mesófilos aerobios se obtuvo  $19 \times 10^1$  UFC, mientras que coliformes totales son menores a 10, mohos y levaduras  $1 \times 10^1$  se encuentran dentro del rango de la tabla EFSA.
2. Se determinó la concentración de polifenoles totales (método de Folin Ciocalteu) teniendo un resultado de 0.875mg/g harina, mientras que hubo ausencia de flavonoides.
3. Se evaluó un modelo experimental de daño oxidativo en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas. Para esto fue necesario realizar adaptaciones en la metodología del ácido tiobarbitúrico (TBARS), que permite medir la concentración del malondialdehído (producto final de la peroxidación) con la inducción del ácido acetilsalicílico (agente hepatotóxico) lo que permitió establecer la actividad antioxidante de los polifenoles presentes en la cascarilla de cacao.

## **RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios químicos posteriores para determinar su composición química y diferenciar comportamientos en cuanto a absorción, metabolización y distribución.
2. Determinar la dosis efectiva de la harina de cacao como antioxidante.
3. Realizar estudios de toxicidad a la harina de cacao para realizar posteriores estudios de formulaciones nutricionales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alvarés, D. (2013). *Método Químico DPPH para determinar la capacidad antioxidante presente en una mermelada*. Guayaquil. Recuperado el 28 de Noviembre de 2016
- AOAC 923.03. (1990). Recuperado el 12 de Febrero de 2017, de Método Gravimétrico para determinación de cenizas totales.
- Armijos, A. (2002). *Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestras de Cacao* (01 ed.). Quito, Ecuador. Recuperado el 12 de Enero de 2017, de Características de acidez como parámetro químico de calidad en muestras de Cacao.
- Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales Libres, Antioxidantes Naturales y Mecanismos de Protección. *Scholarly Journals*(494), 161-172. Recuperado el 09 de Enero de 2017. Recuperado el 12 de Enero de 2017, de <https://search.proquest.com/docview/199584586?accountid=131412>
- Baena, L. (2012). *Obtención y caracterización de fibra dietaria a partir de cascarilla de las semillas tostadas de Theobroma cacao L. de una industria chocolatera colombiana*. Recuperado el 25 de Febrero de 2017, de Universidad Tecnológica de Pereira: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/3036>
- Bhooshany, K., Rizzi, A. (2011). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid medcell longev*, 2(5), 270-278. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016
- Braudeau, J. (1970). *El Cacao* (Primera ed., Vol. 1). Barcelona, España: Blume. Recuperado el 27 de Enero de 2017
- Calderon, V., Noriega, V. (2017). *OBTENCIÓN DE HARINA DE LOS RESIDUOS DE FRUTAS CON MAYOR PODER ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANO. (MARACUYA, CACAO Y PLÁTANO)*. Trabajo de titulación, Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química, Guayaquil. Recuperado el noviembre de 2017
- Chávez, D. (2015). *Caracterización Físico Química y sensorial de treinta Élites de Cacao*. Recuperado el 06 de Febrero de 2017, de Redalyc.
- Contesse. (2010). *EVALUACIÓN DE LA LIPOPEROXIDACIÓN in vitro, A TRAVÉS DE LAS REACCIONES DEL 3-METIL-2-BENZOTIAZOLIDON HIDRAZONA (MBTH) Y DEL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)*. Trabajo de Titulación, Universidad de Chile, Santiago. Recuperado el 19 de Diciembre de 2017

- Bryant, C., Hamaker, B. (1997). Effect of Lime on Gelatinization of Corn Flour and Starch. *Cereal Chemistry*, 74(2), 171-175. Recuperado el 13 de Febrero de 2017
- Cristancho, L., Monroy, R. (2012). *Determinacion de Carbohidratos totales por Espectrometría UV*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia . Recuperado el 18 de octubre de 2017, de <https://es.slideshare.net/LeidyCristancho/manual-de-mtodos-generales-para-determinacin-de-carbohidratos>
- Crosbie. (1991). The relationship between starch swelling properties, paste viscosity and boiled noodle quality in wheat flours. *Journal of Cereal Science*, 13, 145-150. Recuperado el 13 de Febrero de 2017
- ECORAE. (2001). *Compendio de Recomendaciones Tecnológicas para los Principales Cultivos de la Amazonía Ecuatoriana* (1 ed.). Quito, Ecuador. Recuperado el 27 de Enero de 2017
- EFSA. (2008). *European Food Safety Authority*. Recuperado el 05 de Febrero de 2017, de Informe Anual.
- GARCÍA, E., FERNÁNDEZ, I. (2015). *DETERMINACION DE POLIFENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIICALTEU*. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA . Recuperado el JUNIO de 2017
- Gómez, M. (2015). *Estudios de transporte in vitro de flavonoides y biodisponibilidad en humanos*. Universidad Complutense de Madrid , Madrid. Recuperado el Enero de 2018
- Gutiérrez, V. (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Med Milit*, 2(31), 26-33. Recuperado el 04 de Febrero de 2017
- Hernández, J. (30 de Enero de 2013). *CEBAS-CSIC*. Recuperado el 05 de Febrero de 2017, de Mecanismo antioxidante enzimáticos: <https://cienciacebas.wordpress.com/2013/01/30/mecanismos-antioxidantes-de-defensa-ii-mecanismos-enzimaticos/>
- Huerta, M; Ortega, E; Cobos, M; Herrera, J; et al. (Diciembre de 2005). Estrés Oxidativo y el Uso de Antioxidantes en Animales Domésticos. *Scholarly Journals*(12), 728-734,785-787. Recuperado el 08 de Enero de 2017
- INEC. (2014). *Instituto Nacional de Estadística y Censos*. Recuperado el 12 de Diciembre de 2016, de Estadística de ingresos y egresos Hospitalarios: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-de-ingresos-y-egresos-hospitalarios-2014/>
- INEN 0517. (2003). Recuperado el 12 de Febrero de 2017, de Harina de origen vegetal. Determinación del tamaño de las partículas.

- INEN 0534. (1981). Recuperado el 13 de Febrero de 2017, de Determinación del contenido de Fibra cruda - Cacao y sus derivados.
- INEN 0620. (1989). Recuperado el 12 de Febrero de 2017, de Cacao en polvo. Requisitos.
- INEN-ISO 8262-2. (2005). Recuperado el 12 de Febrero de 2017, de DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA POR EL MÉTODO GRAVIMÉTRICO WEIBULL-BERNTROP.
- Izquierdo, A. C., Lang, C. G. R., Jiménez, C., Alejandro C., Jiménez, M., Silvia C., Liera, J. E. G., Denis, B. E. R., & Salinas, K. A. (2009). ESTRÉS OXIDATIVO Y ANTIOXIDANTES EN LA CONSERVACIÓN ESPERMÁTICA. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*(1), 1-38. Recuperado el 23 de Enero de 2017, de <https://search.proquest.com/docview/220919395?accountid=131412>
- Klaassen. (1991). *Reaccion de Fenton*. Obtenido de [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lqf/sordo\\_s\\_jp/capitulo1.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lqf/sordo_s_jp/capitulo1.pdf)
- Knapp, A. (09 de Enero de 1937). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Recuperado el 03 de Febrero de 2017, de Cacao shell and its use as an accessory fodder: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.5000560202/full>
- Coronado, M, Vega, S Et al Gutiérrez, R. (25 de Febrero de 2015). *Universidad Autónoma Metropolitana de México*. Recuperado el 25 de Enero de 2017, de Antioxidantes: perspectiva actual.
- Mayor, O. (16 de MARZO de 2015). Estrés oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. *Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29. Recuperado el 29 de Noviembre de 2016
- Morales, J., García, A., Méndez, E. (2012). Componentes Químicos del Cacao. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(4), 79-81. Recuperado el 10 de Febrero de 2017
- MSP. (23 de Marzo de 2015). *Ministerio de Salud Pública*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de Ministerio de Salud garantiza acceso a la salud de pacientes con cáncer: <http://www.salud.gob.ec/ministerio-de-salud-garantiza-acceso-a-la-salud-de-pacientes-con-cancer-2/>
- Muñiz, P., Coma, M., y Terán, J. (2014). ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO VASCULAR EN PROCESOS DE HIPOXIA. MALONDIALDEHIDO (MDA) COMO BIOMARCADOR DE DAÑO OXIDATIVO. *Revista Médica de Biomedicina* (2), 46-49. Recuperado el 08 de Febrero de 2017, de <http://biomed.uninet.edu/2014/n2/muniz.html>

- OMS. (18 de Febrero de 2015). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de Cáncer: datos y cifras: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- OPS. (12 de Febrero de 2015). *Organización Panamericana de Salud*. Recuperado el 27 de Noviembre de 2016, de Situación del cáncer en la Región de las Américas: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11616%3Aworld-cancer-day-2016&catid=3788%3Acancer-events&Itemid=41707&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11616%3Aworld-cancer-day-2016&catid=3788%3Acancer-events&Itemid=41707&lang=es)
- Rodríguez, C. (2012). *Estudio de la Factibilidad para la Implementación de Agoturismo*. Universidad Tecnológica Equinoccial , Quito. Recuperado el 26 de Enero de 2017
- Rojano, B. (04 de 1997). *Oxidación de lípidos: mecanismo*. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/8413/1/6884161.1997.pdf>
- Royal Botanic Gardens. (13 de Marzo de 2012). *Kew Science*. Recuperado el 06 de Febero de 2017, de Theobroma cacao (cocoa tree): <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/theobroma-cacao-cocoa-tree>
- Rubio, A., Chica, E., & Peñuela, G. (30 de Julio de 2012). Aplicación del proceso Fenton en el tratamiento de aguas residuales de origen petroquímico. *Ingeniería y Competitividad*, 16(2), 211-223. Recuperado el 08 de Febrero de 2017
- Soto, M. (Marzo de 2012). *Redalyc*. Recuperado el 26 de Enero de 2017, de Desarrollo del proceso de producción de Cascarilla de Semilla de Cacao en polvo destinada al consumo humano.
- Zamora, D. (Marzo de 2007). Antioxidantes: Micronutrientes en la lucha por la Salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 34(1). Recuperado el 05 de Febrero de 2017, de ANTIOXIDANTES: MICRONUTRIENTES EN LUCHA POR LA SALUD: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182007000100002](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182007000100002)

## ANEXOS

### LABORATORIO WSS

Inspección & Certificación de Calidad  
Página 1 de 1  
R-LB-15 Rv.08 / 10.11.2016



#### INFORME DE ENSAYO N° 3420-17

Número de OT : 27702  
Cliente : LISSETTE PICOZO  
Dirección : Suburbio Oeste Calle 47 y la B

Laboratorio : Físico Químico  
Tipo de Muestra : Harina Cascarilla de Cacao  
Origen de Muestra : Muestra proporcionada por el cliente  
Temperatura de recepción : 25,0 °C

Tipo de envase : Funda Plástica      Fecha de recepción : 04 de Septiembre del 2017  
Cantidad de Muestra : 900 gr      Fecha Inicio de Ensayo : 05 de Septiembre del 2017  
Hora Recepción : 15:59      Fecha Término de Ensayo : 06 de Septiembre del 2017

#### RESULTADOS DE ANÁLISIS

Muestra - Descripción	Ensayo	Resultado	Incertidumbre	LOD	LOQ	LMR	Métodos
HARINA DE CASCARILLA DE CACAO 5 - 10-01-2017	PROTEINA	14,83 %	-	-	-	-	P-LQ-07 INEN 465 1980-09: Harina de Pescado. Determinación de la proteína Bruta. ISO 5983-2: Animal feeding stuffs-Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content. Part 2: Block digestion/steam distillation method (2009)

#### Comentarios:

6679= HARINA DE CASCARILLA DE CACAO  
5 - 10-01-2017

#### Observaciones:

Los resultados corresponden tan sólo a las muestras sometidas a ensayo.  
La reproducción parcial de este informe no está permitida sin la autorización por escrito de este laboratorio.

Límite de detección = LOD      Límite de cuantificación= LOQ      Límite máximo residual = LMR

Guayaquil, 07 de Septiembre del 2017

Q.F. Jorge Mora P.  
Jefe de Laboratorio Físico-Químico  
WSS ECUADOR S.A.



OFICINAS ADMINISTRATIVAS Y COMERCIAL: Av. Francisco de Orellana Edificio World Trade Center Torre B Piso 3 Of. 323 Phone: 593-4-2630234 - 2630233  
LABORATORIO: Av. de las Américas 1608 y Av. Plaza Dañín - e-mail: wss@wss.ec

#### Anexo 1. Informe de ensayo de proteína cruda proporcionado por WSS

Parámetro	Dilución	Muestras				
		Número de unidades formadoras de colonias (u.f.c.)				
		I	II	III	IV	V
Aerobios Mesófilos	10 <sup>-1</sup>	MNPC	MNPC	MNPC	147	MNPC
	10 <sup>-1</sup>	MNPC	101	MNPC	144	35
	10 <sup>-2</sup>	127	31	121	35	25
	10 <sup>-2</sup>	131	32	121	49	26
	10 <sup>-3</sup>	40	8	22	10	NC
	10 <sup>-3</sup>	32	9	32	12	4
Coliformes totales	10 <sup>-1</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-1</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-2</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-2</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-3</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-3</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
Mohos y Levaduras	10 <sup>-2</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-2</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-3</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-3</sup>	NC	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-4</sup>	1	NC	NC	NC	NC
	10 <sup>-4</sup>	NC	NC	NC	NC	NC

MNPC: Muy numerosas para contar.

NC: No hubo crecimiento.

**Anexo 2. Datos microbiológicos de harina de cascarilla de cacao. Número de u.f.c. encontradas en placas de Petri.**



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA**



Guayaquil, 16 de Noviembre del 2017

Dra. Tania Mori Lucero  
DIRECTORA EJECUTIVA DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN  
SALUD PÚBLICA "DR. LEOPOLDO IZQUIETA PÉREZ" INSPI - LIP  
Ciudad.- Guayaquil

De mi consideración:

LISSETTE KATHERINE PILOZO BERNARDINO, portadora de la cédula de ciudadanía N° 092703878-6, y KAREN DAHIAN DÍAZ LÓPEZ portadora de la cédula de ciudadanía N° 093130597-3 estudiantes del 10° Semestre, Unidad de Titulación período lectivo 2017-2018, Ciclo II, solicitamos muy comedidamente la venta de animales de experimentación, los mismos que serán utilizados para la tesis **"DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA HARINA DE CACAO SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN SISTEMAS BIOLÓGICOS"**, las características necesitadas se describen a continuación:

ESPECIES	EDAD	SEXO	PESO	CANTIDAD
Ratones blancos	7 semanas	machos	20 – 22 gramos	30

Cabe recalcar que estos animales serán utilizados en un pre ensayo, y en relación a los resultados obtenidos requeriremos otra cantidad adicional para la determinación final de la actividad por lo que nos permitimos anexar la siguiente tabla con la cantidad de animales requeridos posteriormente que serán de 50 animales con las mismas características anteriormente mencionadas.

Agradecemos su gentil atención a la presente, y sin otro particular nos suscribimos de usted,

Atentamente,

*Karen Díaz López*

Karen Díaz López  
Teléf. 0960701823  
[dahian92@hotmail.com](mailto:dahian92@hotmail.com)

*Lissette Pilozo Bernardino*

Lissette Pilozo Bernardino  
Teléf. 0994411908  
[lsspilozo26@hotmail.com](mailto:lsspilozo26@hotmail.com)

16 NOV 2017 11:25

**Anexo 3. Oficio enviado al INSPI para la solicitud de compra de animales de experimentación.**

**PESO DE ANIMALES (GRAMOS)**

N	A	B	D	E	F	G
	CONTROL	CONTROL VIT.A	INDUCTOR. ASPIRINA	HARINA Conc. 100mg/Kg	HARINA Conc. 50mg/Kg	HARINA Conc. 25mg/Kg
1	38,4	37,8	40,6	37	35,9	39,7
2	36,4	37,2	37,1	41,6	37,6	37,9
3	38,1	34,0	33,7	39	38,1	35,1
4	31,6	30,8	34,7	34,8	39,6	40,4
PESO PROMEDIO	36,125	34,95	36,525	38,1	37,8	38,275

**Anexo 4. Conformación de grupos de animales**

N	CONTROL VIT.A - Peso ratones-	Dosis 60mg/Kg
1	37,8	2,268
2	37,2	2,232
3	34,0	2,04
4	30,8	2,232

**Anexo 5. Dosis de tratamiento con vitamina A**

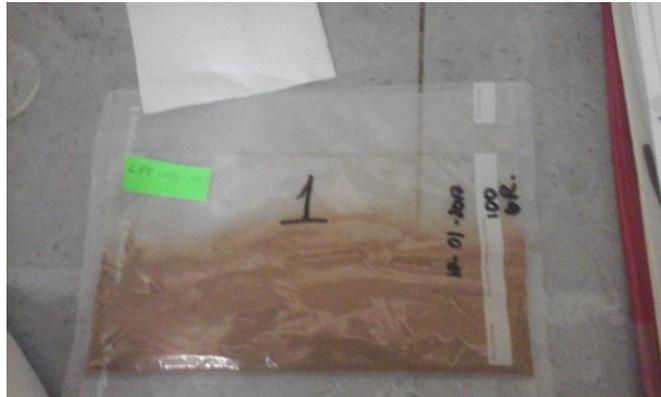
N	INDUCTOR. ASPIRINA - Peso ratones-	Dosis (600mg/Kg)
1	40,6	24,36
2	37,1	22,26
3	32,2	19,32
4	33,7	20,22

**Anexo 6. Inducción con ácido acetil salicílico**

<b>Absorbancias de las muestras a 535 nm</b>						
<b>N</b>	<b>Control</b>	<b>Vit.A</b>	<b>Inducción</b>	<b>Harina Dosis 1</b>	<b>Harina Dosis 2</b>	<b>Harina Dosis 3</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>G</b>
<b>1</b>	0,047	0,05	0,083	0,062	0,045	0,064
<b>2</b>	0,049	0,045	0,111	0,077	0,043	0,045
<b>3</b>	0,049	0,049	0,106	0,067	0,031	0,046
<b>4</b>	0,047	0,05	0,111	0,055	0,044	0,046

**Anexo 7. Cuantificación de Malondialdehído (MDA)**

## FOTOS DE LA REALIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS FÍSICOS QUÍMICOS



Harina de cascarilla de cacao empacada al vacío



Granulometría – peso del residuo de harina tamizado



Análisis de Humedad



Crisol con muestra de harina para determinación de cenizas totales



Determinación de contenido de grasa

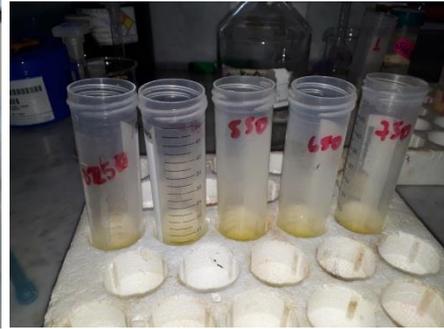


Determinación de fibra cruda

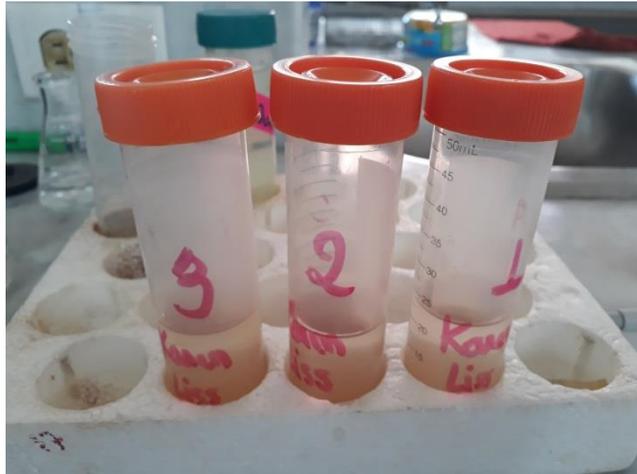




Determinación de Azúcares totales

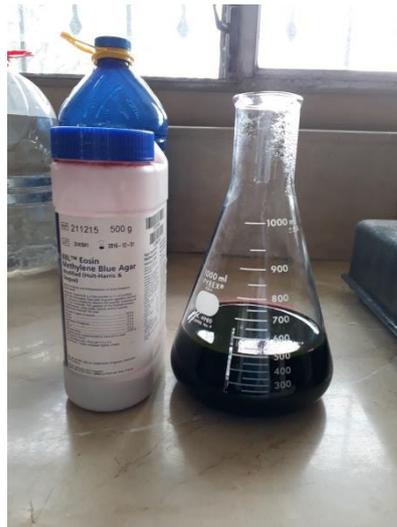


Contenido de fenoles totales – método de Folin Ciocateu



Contenido de flavonoides - quercetina

## FOTOS DE LA REALIZACIÓN DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



Preparación de los Agares utilizados para la determinación de mesófilos, aerobios, coliformes totales, mohos y levaduras



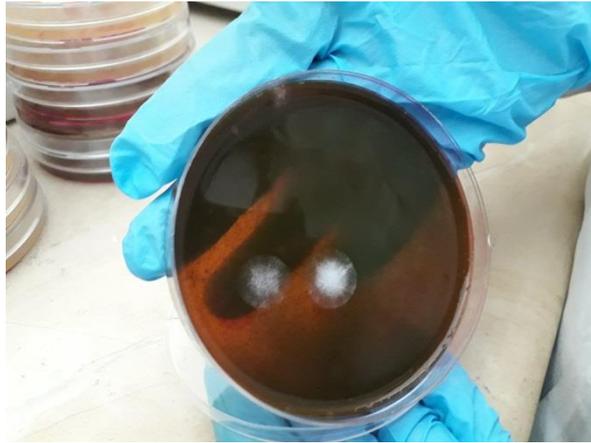
Análisis microbiológicos para determinación de mohos y levaduras



Análisis microbiológicos para determinación de coliformes totales



Análisis microbiológicos para determinación de mesófilos aerobios



Conteo de colonias de coliformes totales

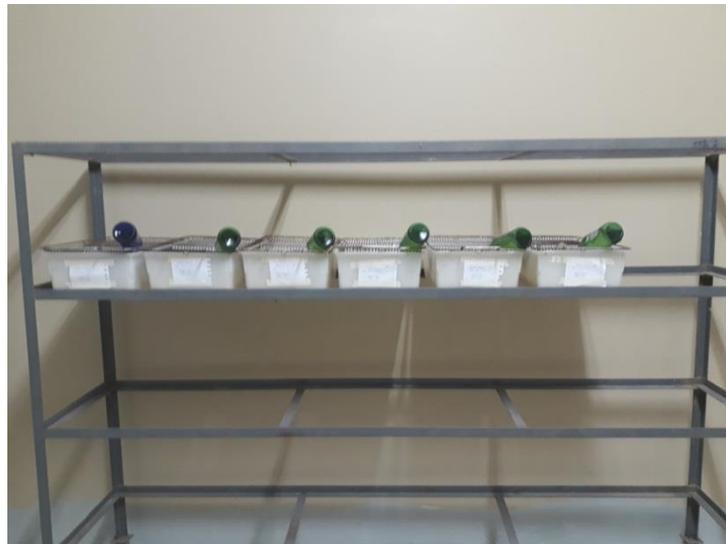


Conteo de colonias de mesófilos aerobios

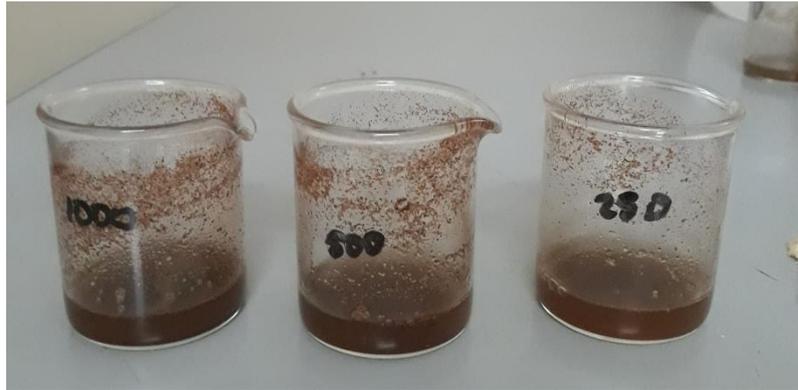


Conteo de colonias de mohos y levaduras

## FOTOS DE LA REALIZACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA



Recepción de animales y conformación de grupos



Preparación de dosificación de harina



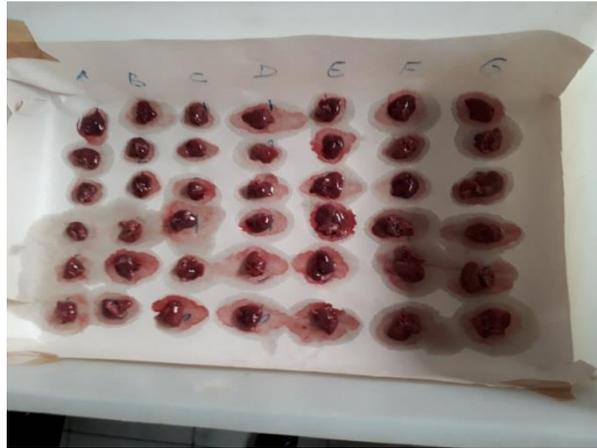
Administración de harina a diferentes dosis, vitamina A e inducción con ácido acetil salicílico



Preparación de materiales necesarios para la eutanasia de animales



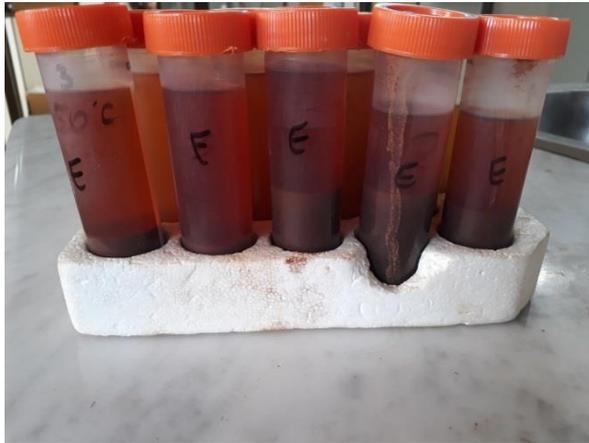
Eutanasia de animales y procedimiento de extracción de hígados



Hígados extraídos



Peso de hígados para preparación del homogenato

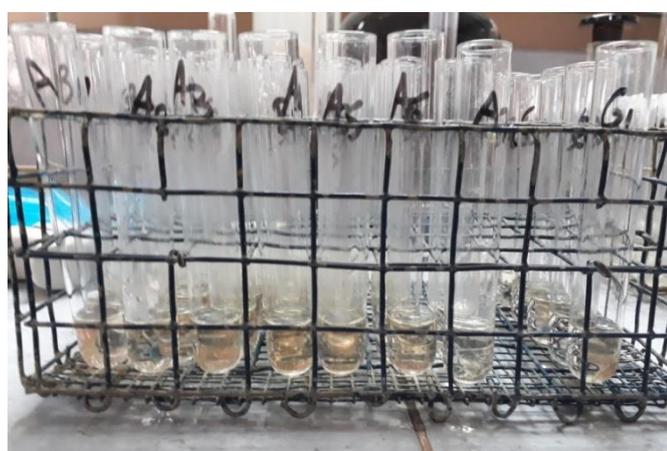


Preparación de la muestra





Reactivos que se colocaron a los sobrenadantes para reacción de TBA



Cambio de coloración



Lectura final en espectrofotómetro