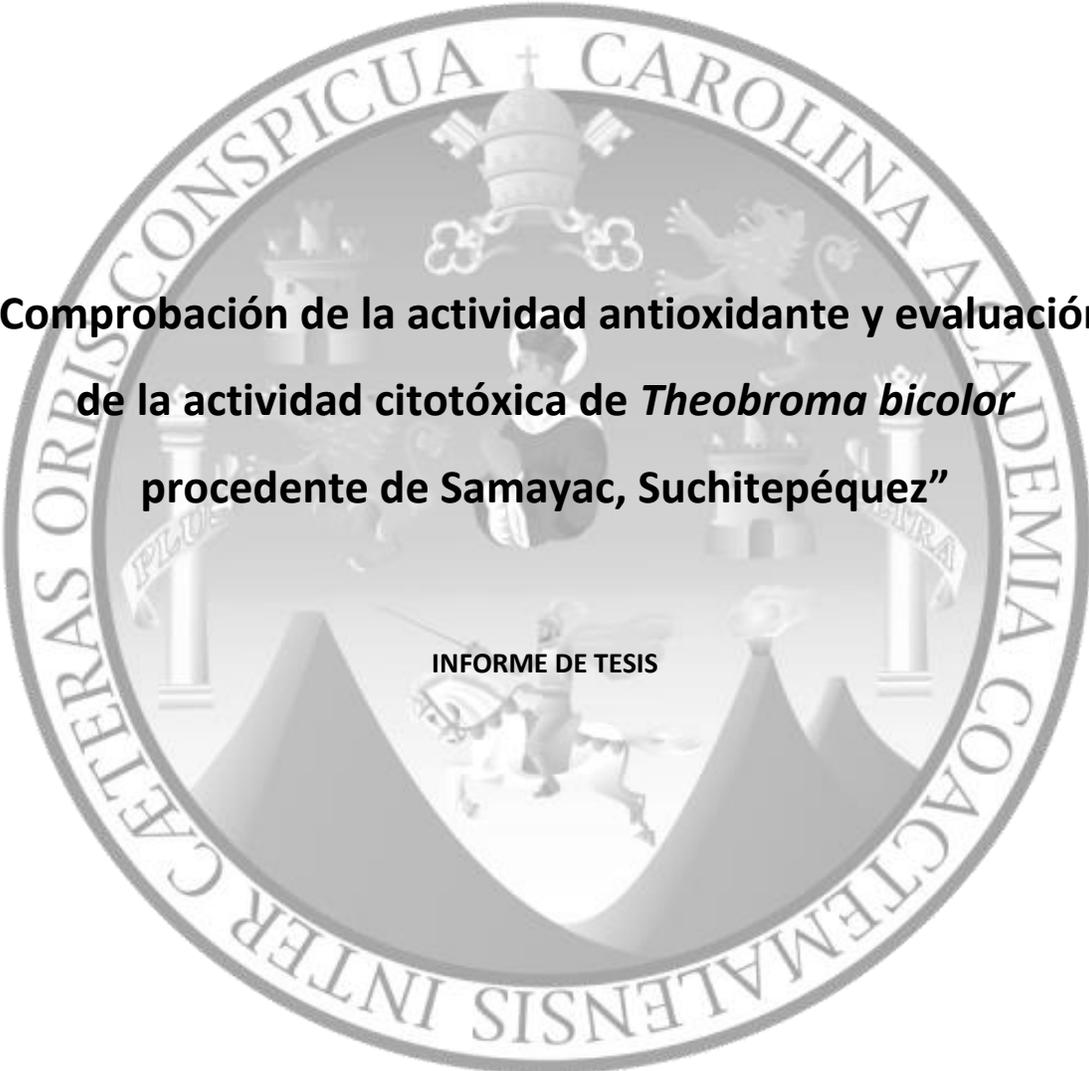


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

The seal of the Universidad de San Carlos de Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a cross, and other heraldic symbols. The shield is flanked by two columns. Above the shield is a crown. The entire emblem is surrounded by a circular border containing Latin text: "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CÆTERAS ORBIS CONSPICUA".

**“Comprobación de la actividad antioxidante y evaluación  
de la actividad citotóxica de *Theobroma bicolor*  
procedente de Samayac, Suchitepéquez”**

INFORME DE TESIS

LIBNY JUDITH PERNILLO HIDALGO

Química Farmacéutica

Guatemala, octubre de 2018.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



“Comprobación de la actividad antioxidante y evaluación  
de la actividad citotóxica de *Theobroma bicolor*  
procedente de Samayac, Suchitepéquez”

INFORME DE TESIS

Presentado por

LIBNY JUDITH PERNILLO HIDALGO

Para Optar al Título de

Química Farmacéutica

Guatemala, octubre de 2018.

## JUNTA DIRECTIVA

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

## DEDICATORIA

A NUESTRO PADRE CELESTIAL: Ser que bendice todos los días de nuestras vidas y permite que podamos alcanzar nuestras metas.

A MIS PADRES Y HERMANA: Por su amor y esfuerzo demostrado a través de su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida.

A MI FAMILIA: Por su cariño y apoyo recibidos.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA Y LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA: Fuente inagotable de todo conocimiento.

A Dra. SULLY CRUZ, Licda. NEREIDA MARROQUÍN, Lic. ARMANDO CÁCERES Y Licda. BEATRIZ MEDINILLA: Por el apoyo y guía recibidos, sin los cuales no hubiera logrado culminar este proyecto.

A la familia LIPRONENSE: Por el apoyo recibido y por brindarme su amistad.

## AGRADECIMIENTOS

<b>A DIOS</b>	Por darme la oportunidad de realizar este proyecto. Por tener infinita misericordia y permitirme culminar esta etapa. Gracias por nunca desampararme y siempre cuidarme.
<b>A MI FAMILIA</b>	Por su apoyo y amor incondicional, por ser el pilar de mi vida.
<b>A Dra. Sully Cruz</b>	Por brindarme su tiempo, apoyo, orientación y asesoría para realización de este proyecto. Por la confianza recibida y por permitirme ser parte del Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica
<b>Licda. Nereida Marroquín</b>	Por todo el apoyo, orientación brindada y por compartir su conocimiento. Por su amistad y confianza. Por alentarme a continuar.
<b>Lic. Armando Cáceres</b>	Por su colaboración para la recolección de muestra vegetal utilizada en esta investigación. Sin el cual no habría podido realizar este proyecto.
<b>Licda. Beatriz Medinilla</b>	Por su interés, apoyo y guía brindadas.
<b>Al LIPRONAT y Departamento de Farmacognosia y Fitoquímica</b>	Por brindarme los materiales y equipo necesarios para realizar este proyecto de investigación. Y por el conocimiento adquirido.
<b>A la familia Lipronense</b>	Con los quien tuve la oportunidad de compartir y conocer, por su amistad y por su apoyo. A Karla Toj, Nereida Marroquín, Sofía Marroquín, Lorena Rochac, Max Mérida, Marcela Orellana, Alejandra Morales, Harlem De León, Sarita, Carol Bethancourt y todos los lipronenses que tuve la oportunidad de conocer.
<b>A la Licda. Karla Toj y Licda. Sofía Marroquín</b>	Por su apoyo y amistad en la realización de este proyecto de investigación.
<b>A la escuela de Química Farmacéutica</b>	Por su apoyo, en especial a la Licda Julia García, Licda. Lucrecia de Hasse, Lic. Estuardo Serrano, Licda Hada Alvarado, Licda Beatriz Medinilla y Licda. Aylin Santizo.

## INDICE

1.	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	3
3.	ANTECEDENTES	4
4.	JUSTIFICACIÓN	13
5.	OBJETIVOS	14
6.	HIPÓTESIS	15
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	16
8.	RESULTADOS	32
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
10.	CONCLUSIONES	51
11.	RECOMENDACIONES	52
12.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	53
13.	ANEXOS	57

## 1. RESUMEN

*Theobroma bicolor* o pataxte es una especie poco conocida que se extiende desde México hasta Brasil. En Guatemala se cultiva en la costa sur y en el norte de Alta Verapaz, la pulpa del fruto se come cruda y se usa en la elaboración de bebidas. De esta especie se ha reportado su composición química y capacidad antioxidante en otros países, no así en Guatemala. Los compuestos fenólicos son moléculas cuya concentración en la mayoría de casos esta correlacionada con la capacidad antioxidante por lo que se hace necesaria su determinación.

El objetivo de la presente investigación fue comprobar la capacidad antioxidante reportada y evaluar el potencial citotóxico de extractos obtenidos de hojas, corteza y fruto de *Theobroma bicolor*. Los métodos utilizados para evaluar la actividad antioxidante se basan en la captura y reducción de radicales libres como el Método del DPPH, (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), Método del ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico), FRAP (reducción de Hierro) y Fenoles Totales. El potencial citotóxico fue evaluado frente a *Artemia salina* y el contenido de fenoles se cuantificó como equivalentes de ácido gálico.

Los extractos etanólicos de hojas, corteza, cáscara y semillas presentaron la mejor actividad antioxidante con todos los métodos, también estos extractos fueron los que presentaron el mayor contenido de fenoles totales comparados con los extractos hexánicos, diclorometánicos y de acetato de etilo. Al analizar los extractos apolares (hexánicos) y medianamente polares (diclorometánicos y acetato de etilo) obtenidos a partir de las semillas del fruto se encontró que no poseen actividad antioxidante, se realizó la identificación de los ácidos grasos presentes en ellos por medio de cromatografía de gases, conteniendo en su mayoría ácidos grasos saturados: mirístico, palmítico, margárico, caproico, araquídico, behénico y melísico en dichos extractos.

En la prueba de citotoxicidad se evaluó la tolerancia de *A. salina* contra todos los extractos obtenidos de *Theobroma bicolor*. Se encontró que los extractos no poseen citotoxicidad, ya que el porcentaje de mortalidad obtenido fue menor al 50%.

Se comprobó la actividad antioxidante en extractos etanólicos de *Theobroma bicolor*, se evidenció la correlación entre la capacidad antioxidante y la concentración de compuestos fenólicos en estos, siendo que a mayor concentración de fenoles mayor capacidad antioxidante. Y en cuanto a los metabolitos evaluados, los extractos presentan alcaloides, flavonoides, aceites esenciales y ácidos grasos determinados mediante pruebas cualitativas. Por lo anterior *Theobroma bicolor* es una especie con potencial para su uso como antioxidante en medicina, cosmética y en alimentos.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales endémicas de Guatemala son de gran interés por su valor comercial, farmacológico, industrial, aromático, comestible, etc. siendo una parte esencial para su utilización el conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en la planta, como los compuestos fenólicos. Este grupo de compuestos contienen en su estructura un anillo aromático hidroxisustituido, y son conocidos por su relación con la actividad antioxidante. La actividad antioxidante es el potencial de una molécula o especie química de prevenir la oxidación de otra molécula, y pueden actuar en el cuerpo como antiinflamatorios, anticancerígenos, y preventivos en enfermedades cardiovasculares, circulatorias y degenerativas. En los alimentos se pueden incluir como preservantes para extender y mantener la calidad de estos (Londoño, 2012)

En *Theobroma bicolor*, se han identificado diversos compuestos fenólicos, dentro de ellos flavonoides y antocianinas. *T. bicolor* es un árbol que crece silvestre. Es nativo de Guatemala y pertenece a la familia de las esterculiáceas. *T. bicolor* es una especie de la que no se habían realizado estudios en Guatemala, sin embargo sí se han realizado investigaciones en Brasil y Perú, presentando una elevada capacidad antioxidante en el fruto. Es por esta razón que se realizó el análisis de compuestos fenólicos de los extractos diclorometánicos, hexánicos, acetato de etilo y etanólicos de hojas, corteza y fruto (cáscara, pulpa y semilla), para comprobar la capacidad antioxidante de esta especie procedente de Suchitepéquez, validar dicha actividad en nuestra región y compararlo con las especies procedentes de Perú y Brasil (García, Sotero, Mancini, Pavan y Manzini, 2011).

A su vez se hizo necesario estudiar la actividad citotóxica general contra *Artemia salina*, este organismo al poseer alta sensibilidad a tóxicos se puede utilizar un volumen pequeño de muestra para evaluar su toxicidad. Y al poseer esta especie elevada capacidad antioxidante, para su aplicación se debe garantizar su seguridad, además de determinar la posible actividad antitumoral, que en algunos casos se relaciona con la actividad antioxidante (Díaz, Rodríguez, y Scull, 2010).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Estudios realizados sobre *Theobroma bicolor*

##### 3.1.1 Descripción botánica

Este árbol pertenece a la familia de las Esterculiaceas y según León (2000), en su libro “*Botánica de los cultivos Tropicales*”, *Theobroma bicolor* es un árbol bajo de ramificación dimórfica, que crece desde México a Brasil, se le conoce como Pataste, Pataxte, Cacao Blanco, Bacao, Cacao Silvestre y Macambo.

*Theobroma bicolor* puede alcanzar desde 3 m hasta 25 a 30 m de altura y 20 a 30 cm de diámetro, gris; cuando es cultivado llega a tener menores dimensiones. Su copa es oblonga e irregular, con escasos verticilos de tres ramas pendulares que pueden llegar a tocar el suelo. La corteza externa es agrietada color beige gris (González y Torres, 2010). Según *FAO Forestry Department*, (1986) en el libro “*Food and fruit bearing forest species*” *T.bicolor* crece casi siempre en suelos bien drenados.

Las hojas de *T. bicolor* son simples, alternas, perennes con estipulas oblongas y lanceoladas de 5-8 mm de largo y 1.2 2 mm de ancho; nerviación palmeada con 5 a 7 nervios conspicuos en el envés; haz blanquecino. Sus láminas son dimorfas en el tronco, ampliamente ovado cordadas, de 12 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de ancho, en las ramas laterales de forma oblonga a elíptico-ovadas. En general las láminas son cactáceas, palminervadas, enteras de ápice acuminado y base cordada, envés tomentoso, gris plateado y con nerviación conspicua. Pecíolo de 1,2 a 2,5 cm o de 10 a 38 cm de largo (Flores, 1997; Ruiz, 1993 y *FAO Forestry Department* 1986).

*T. bicolor* posee inflorescencia axilar en ramas jóvenes, flores regulares bisexuales, color rojo purpúreo; cáliz con cinco sépalos, corola con cinco pétalos; cinco estambres unidos con los estaminodios formando un tubo; con ovario súpero pentacarpelar (Flores, 1997; Ruiz, 1993).

El fruto es de forma elipsoidal, es la más grande del género *Theobroma*, de unos 10 a 35 cm de largo por 12 a 15 cm de ancho, peso entre 0,5 y 3,0 kg, la cáscara es leñosa y dura, de 12 mm de espesor, con cinco ó muchas fisuras, de color amarillo cuando madura. El pericarpio es grueso y duro, cubierto de reticulaciones, que nacen en el extremo de las ramas plagiotrópicas. El fruto cae al suelo cuando está maduro (González y Torres, 2010; León, 2000).

El porcentaje en peso de pulpa es de 23.76%, de la cáscara es 62.54% y de las semillas de 13.70% El fruto cuenta con aproximadamente 38 semillas, éstas son ovales, planas de 16 a 30 mm de largo y de 14 mm a 25

mm de ancho, y de 8 a 13 mm de espesor, cubiertas de un arilo grueso, fibroso, de succulento de color (González y Torres, 2010)

### 3.1.2 Composición Química

El valor de lípidos del fruto de *T. bicolor* es 32.95 %, proteínas 13.30 %, fibras alimenticias insolubles (FAI) de 9.90% y fibras alimenticias solubles (FAS) de 2,30 %, estos son complejos muy importantes que ejercen efectos fisiológicos directos a través del tracto intestinal. También contiene 57.94% de ácidos grasos saturados de fracción lipídica (destaca el ácido esteárico); y 42.03% de ácidos grasos, (39.9% de ácido oleico) (González y Torres, 2010)

En el estudio "*Composition of the fat extracted from the seeds of theobroma bicolor*" (Jee, 1984) se analizó el contenido de glicéridos por cromatografía en capa fina y también la composición de los ácidos grasos y triglicéridos (por medio del número de carbonos) utilizando cromatografía de gases. Se encontró 96.5% de triglicéridos y 2.5% de diglicéridos y 1.7% de ácidos grasos libres en la grasa.

En 1991, Sotelo y Alvarez investigaron la composición química de *T. bicolor*, comparado con *Theobroma cacao*. Realizaron análisis del fruto, pulpa, cáscara, y de hojas para inhibidores de tripsina y hemaglutinas. En *T. bicolor* se encontró alta concentración de alcaloides en la cáscara, seguido de las flores y hojas.

En 2007, se aislaron compuestos volátiles del fruto de *T. bicolor* por medio de microextracción en fase sólida (HS-SPME) y extracción líquido-líquido. Los concentrados volátiles se examinaron por cromatografía de gases y espectrometría de masas combinadas. Se identificó un total de 65 y 123 compuestos en la extracción HS-SPME y líquido-líquido del fruto (Quijano y Pino, 2011).

### 3.1.3 Actividad Antioxidante

Los antioxidantes son sustancias que presentan la propiedad de inhibir o prevenir la oxidación de otras moléculas. Existen varios compuestos que presentan actividades antioxidantes tanto naturales como sintéticas. Es necesario realizar investigaciones para identificar estas sustancias, además que su distribución en la naturaleza es variada, porque los podemos encontrar en frutas, vegetales, granos, y otros productos derivados de las plantas. Dentro de los principales antioxidantes que podemos encontrar en las plantas, se encuentran los compuestos fenólicos con sus diferentes estructuras químicas. Estos se pueden dividir en ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, isoflavonoides, estilbenos, lignanos y polímeros fenólicos. Dentro de éstos, los flavonoides y antocianinas muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas, además de poseer actividad anti-inflamatoria,

antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (Craft, 2012; Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini y Fett, 2005).

En 2011 estudiaron la actividad antioxidante de *T. bicolor* en la región amazónica peruana. Su objetivo fue evaluar la capacidad antioxidante “in vivo” de *T. bicolor* mediante la ingesta de extractos acuosos en ratones y realizar el análisis comparativo del perfil de ácidos grasos. Utilizaron 32 ratones albinos Wistar a los que se les administró 200 µL de extracto, y obtuvieron que en el tejido adiposo, los ácidos grasos poliinsaturados fueron superiores a los de control, destacando el grupo de *T. bicolor* con 40%. En el cerebro, hubo un incremento en la concentración de ácido oleico para el grupo *T. bicolor* 21,77%; y así mismo, los ácidos grasos poliinsaturados fueron superiores a los de control, *T. bicolor* con 48,57% (García, Sotero, Mancini, Pavan y Manzini, 2011).

A su vez, Sotero, Maco y otros (2011) en “Evaluación de la actividad antioxidante y Compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia *Sterculiaceae*” concluyeron que *Theobroma bicolor*, presentó una concentración de inhibición al 50% (CI<sub>50</sub>, mg/mL) en semillas de 7.55, superior a las demás especies que estudiaron. En la pulpa encontraron 5,738.1 mg/100g de compuestos fenólicos totales, 711.68 mg/100g de flavonoides y 51.84 mg/100g de antocianinas. De estos valores es importante destacar que los compuestos fenólicos totales y flavonoides en pulpa fueron los mayores dentro de las cuatro especies estudiadas. En las semillas encontraron 61.37 mg/100g de compuestos fenólicos totales, 30.30 mg/100g de flavonoides y 7.47 mg/100g de antocianinas, estos valores son los más bajos dentro de las cuatro especies analizadas. En las semillas también se cuantificó por HPLC 7022.0 mg/100 g rutina trihidratada. Además se encontró ácido salicílico, ácido trans-cinámico, ácido p-hidroxibenzoico, protocatequina, ácido gálico, ácido sináptico, y también catequina y ácido clorogénico. (Sotero et al., 2011).

En “*Antioxidant activity of Theobroma bicolor L. extracts*” se describen los resultados obtenidos de los extractos etéreos, etanólicos y acuosos, encontrándose que la actividad antioxidante fue de 47%, 68% y 67% respectivamente, siendo la del control 64% (BHT, Butilhidroxitolueno). Se obtuvo la capacidad antioxidante de tres fracciones fenólicas con tetrahidrofurano: ácidos fenólicos libres (83%), esteres fenólicos solubles (85%) e insolubles (93%). También identificaron ácidos fenólicos comparando los tiempos relativos de retención con estándares y encontraron también ácido salicílico, ácido transcinámico, ácido sinapínico, clorogénico, protocatequinico, ácido gálico, ácido quínico y ácido p-hidroxibenzoico. Los autores concluyen que los compuestos fenólicos se relacionan con la actividad antioxidante observada en los extractos, es por ello que se pretende comprobar la actividad antioxidante de la especie colectada en Guatemala y evaluar el contenido de compuestos fenólicos (García, Assunção, Mancini, Pavan y Mancini, 2002).

### 3.1.4 Usos

El fruto de *T. bicolor* es comestible, su pulpa se consume cruda y tiene un sabor dulce y agridulce; se emplea en la fabricación de bebidas refrescantes, helados y chocolates. Las semillas cocidas a la brasa son muy agradables y tienen un sabor harinoso agradable, similar al de las habas cocidas.

En Centroamérica se cultiva por las semillas, que al mezclar con azúcar y achiote se preparan dulces, también se consume en bebidas frías y calientes. A partir de estas se fabrica un chocolate de inferior calidad que el fabricado a partir de *Theobroma cacao*, aunque la manteca que se extrae de la semilla es buena. Además en Perú las semillas se venden asadas, fritas en aceite vegetal y envasadas.

En la agroindustria esta especie puede tener elevado potencial ya que el 100% del fruto con cáscara suave puede ser utilizado para la alimentación de animales domésticos como cerdos, ganado vacuno y otros. Puede producir aproximadamente 71.87 toneladas de biomasa total por hectárea y captura 32.34 toneladas de carbono por hectárea (González y Torres, 2010; *FAO Forestry Department*, 1986).

## 3.2 Descripción de los metabolitos secundarios relacionado con la actividad antioxidante observada en *Theobroma bicolor*

### 3.2.1 Flavonoides y Antocianinas

Entre los compuestos fenólicos se encuentran los flavonoides. Tienen un esqueleto carbonado que contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. En función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, existen:

3.2.1 Antocianinas (pigmentos)

3.2.2 Flavonas,

3.2.3 Flavonoles

3.2.4 Isoflavonas.

Dentro de sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación, y la primera etapa de su biosíntesis en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por chalcona sintetasa y da lugar a naringerina chalcona, precursor de los flavonoles y antocianinas (Ávalos y Pérez, 2009).

Las antocianinas son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos, son glicósidos con un azúcar en posición 3. Cuando las antocianinas carecen de azúcar se denominan antocianidinas. Son de importancia porque contribuyen a la polinización y en la dispersión de semillas. El color de las antocianinas depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las

vacuolas en las que se almacenan. Algunos ejemplos son pelargonidina (rojo-naranja), cianidina (rojo púrpura) y delphinidina (azul púrpura), mientras que los flavonoides presentan coloraciones amarillas (Ávalos y Pérez, 2009).

Las antocianinas son estables como sales en medio ácido. Su extracción puede llevarse a cabo con una mezcla de agua-acetona (20:80); ó agua-alcohol (metanol o etanol) en caliente, la proporción de agua depende del estado de la muestra, fresca o seca; luego se realiza una extracción líquido-líquido con disolventes inmiscibles con agua (hexano o acetato de etilo, en este último se obtienen los heterósidos que son de interés) (Orantes, 2008).

### **3.3. Actividad antioxidante**

Según Rincón y colaboradores (2011) diversos compuestos presentes en productos vegetales tienen la propiedad de actuar como antirradicales o antioxidantes, en estos productos se ha evidenciado la presencia de los compuestos fenólicos que tienen propiedades antioxidantes. La actividad de los polifenoles se encuentra asociada a la prevención de enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como son los procesos degenerativos de la memoria, según Gaitán, (2009) los antioxidantes son compuestos que inhiben o retrasan la oxidación de otras moléculas al terminar el inicio o la propagación de la cadena de reacciones de oxidación.

Los fenoles, especialmente los flavonoides y los antocianos, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades tales como: cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas. Poseen actividades anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (Kuskoski et al., 2005).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las técnicas más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical. La pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos brinda tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski et al., 2005).

Diversos compuestos cromógenos, como ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico), DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamina), DMPO (N-óxido de 5,5-dimetil-1-pirrolina) y FRAP (poder antioxidante de la reducción férrica); son utilizados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos para captar los radicales libres generados, operando así en contra los efectos

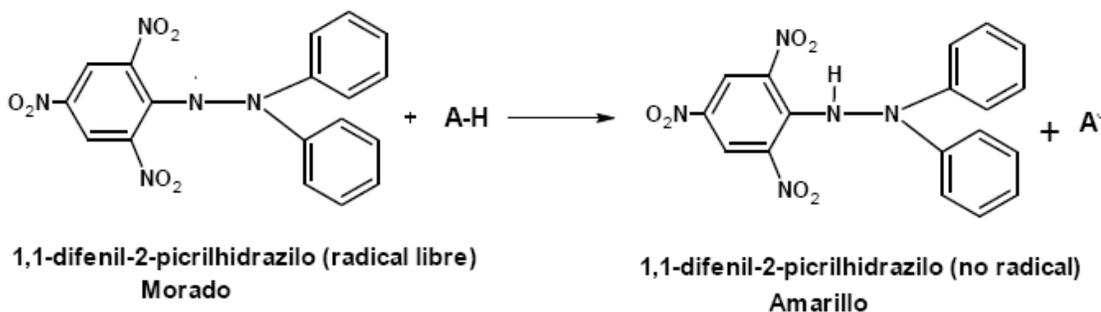
perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican a especies reactivas de oxígeno (Kuskoski et al., 2005).

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El método con DPPH es simple y rápido. Éste es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Kuskoski et al., 2005).

### 3.3.1 Método con DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

Este método se basa en la capacidad del radical libre DPPH<sup>•</sup> para aceptar un átomo de hidrógeno (H<sup>+</sup>). El DPPH es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual ésta no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a 515-517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno como se muestra en la figura 1, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de las propiedades antioxidantes (Alam, Bristi y Rafiqzaman, 2012)

Figura 1. DPPH antes y después de reaccionar con el compuesto antioxidante.



Fuente: (Alam et al., 2012)

Los resultados de este método se pueden expresar como el valor de la concentración media inhibitoria (CI<sub>50</sub>), es decir, como la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración inicial de DPPH al

50%. Este valor se calcula graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración del extracto. Para extractos de plantas o compuestos puros el valor CI50 cambia de acuerdo a la concentración final del DPPH<sup>+</sup> usado (Deng, Cheng y Yang, 2011).

- Desventajas del método con DPPH:

La diferencia en el mecanismo de reacción que normalmente ocurre entre antioxidante y radicales peroxilo:

DPPH<sup>+</sup> es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica. Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo, lo hacen lentamente o son inertes al DPPH.

La reacción cinética entre el DPPH<sup>+</sup> y los antioxidantes no es lineal con la concentración de DPPH<sup>+</sup>, por lo cual es arbitrario medir la capacidad antioxidante usando CI50.

- Identificación:

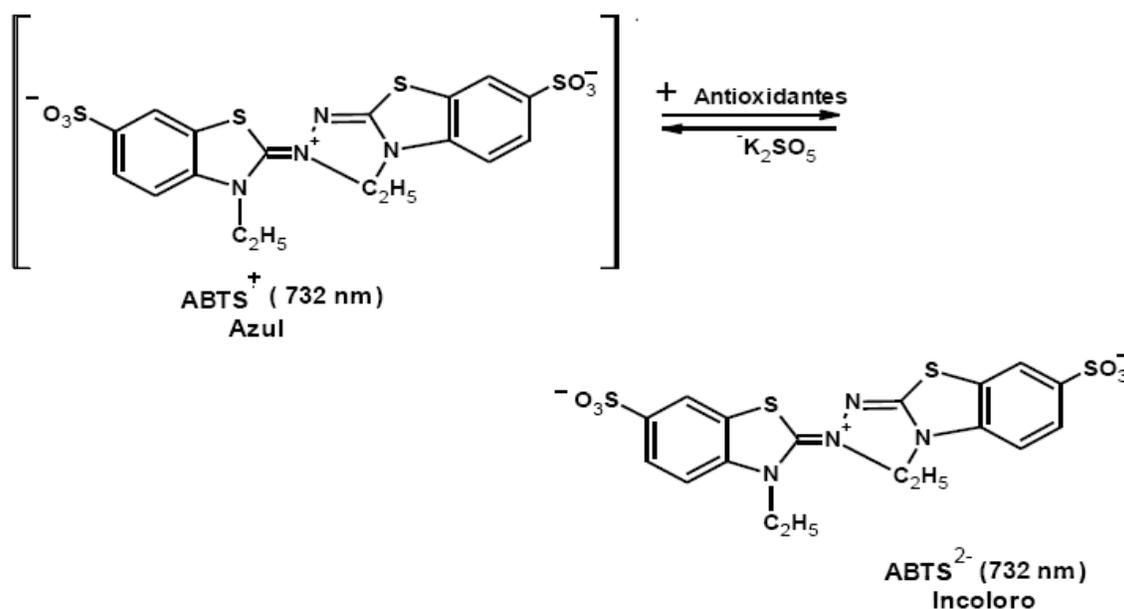
#### **Reactivo DPPH:**

Este método se basa en la generación de radicales libres a partir de una solución metanólica de 1,1- difenil-2-picril-hidracil (DPPH) En forma de radical, el DPPH<sup>+</sup> absorbe a 515 nm, absorbancia que va disminuyendo por la reducción por un agente oxidante, o por especies radicales. Esta absorción característica a 515 nm (color púrpura), decrece significativamente cuando está expuesto a la acción de barrido por parte de un extracto rico en compuestos fenólicos antioxidantes- por suministro de átomos de hidrógeno o por donación de electrones (Rincón et al., 2011). Entonces cuando existe decoloración de las manchas, se da una disminución en la absorbancia, a 515 nm, que indica alto barrido o actividad antioxidante del radical por parte del extracto. Este ensayo permite evaluar en forma rápida la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos específicos o extractos (Rincón et al., 2011).

#### **3.3.2 Método con ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico):**

Este método consiste en la técnica de decoloración, en la cual el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re et al., 1999). Implica la producción directa del cromóforo ABTS verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS<sup>+</sup> está determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

Figura 2. ABTS antes y después de reaccionar con el compuesto antioxidante.



Fuente: Zuleta, Esteve y Frigola, 2009.

### 3.3.3 Método con FRAP (poder antioxidante de la reducción férrica, por sus siglas en inglés)

El método de FRAP consiste en medir el incremento en la absorbancia a 593 nm (azul) que se desarrolla cuando el complejo TPTZ-Fe<sup>3+</sup> se reduce a TPTZ-Fe<sup>2+</sup> (Benzie y Strain, 1996). De esta forma, la capacidad antioxidante que presentan los extractos de diferentes frutas y vegetales se mide como la capacidad reductora del extracto.

La reducción del ión férrico a ferroso produce un complejo coloreado de tripiridiltriácina ferroso. Los valores de FRAP son obtenidos comparando el campo de absorbancia a 593 nm en una mezcla de reacción que contiene iones ferrosos en concentraciones conocidas. Los cambios en la observancia son lineales sobre un amplio rango de concentración con mezclas de antioxidantes (Benzie y Strain, 1996).

### 3.4 Actividad Citotóxica

La evaluación de citotoxicidad es un parámetro básico en la evaluación de muestras, es una prueba que evalúa la actividad tóxica general no específica de extractos vegetales. Estas representan evidencias experimentales en la búsqueda de nuevos compuestos y se emplean de forma rutinaria como métodos de tamizaje de extractos naturales y compuestos puros con potencialidades en la terapia contra el cáncer y como insecticidas (Pozo, Irahola y Gimenez, 1997; Díaz, Rodríguez, y Scull, 2010).

### 3.4.1 Actividad citotóxica contra nauplios de *Artemia salina*

*Artemia salina* es un crustáceo cuyas nauplios (larvas) son sensibles a gran variedad de sustancias y a amplios rangos de concentraciones de sal. La toxicidad contra estos crustáceos presenta buena correlación con la actividad antitumoral. Para el tamizaje de la actividad citotóxica se analiza la tolerancia de nauplios de *A. salina* en diluciones seriadas del extracto en agua de mar (Fuentes, 2012).

### 3.4.2 Cálculo de $DL_{50}$ con Statgraphics

La regresión Probit consiste en un tipo particular de regresión lineal que se construye con el objetivo de conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de una muestra a evaluar su toxicidad) y una variable dependiente (la respuesta = mortalidad) para una especie y una exposición determinada (normalmente 48 o 96 horas). Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades probit (eje Y) y la concentración de tóxico se transforma logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual se puede interpolar el 50% de la respuesta y conocer qué concentración de tóxico causa esa respuesta ( $DL_{50}$ ). La concentración letal media ( $CL_{50}$ ), para un tiempo dado, normalmente 48 o 96 horas, es la concentración letal 50, es decir la concentración de tóxico necesaria para causar la muerte del 50% de la población de estudio en un tiempo determinado.

Para calcular la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) es necesario realizar una regresión concentración-respuesta. Si se representa la mortalidad acumulada en % (en el eje Y) y la concentración en el eje X (log-In transformado) de los datos lo que obtenemos es una respuesta de tipo sigmoideal. El objetivo principal de la transformación probit es hacer lineal la relación entre dosis-respuesta. La transformación probit procede de la Desviación Equivalente normal (NED, por sus siglas en inglés: Normal Equivalent Deviation), que es la proporción de mortalidad expresada en unidades de desviación estándar de la media de una curva normal. Se suele sumar 5 a la NED para evitar valores negativos (Fernández, 2014).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

*Theobroma bicolor* (pataxte o macambo) es una especie nativa guatemalteca que crece silvestre, y se distribuye desde México, América Central y pertenece a la familia de las esterculiáceas. Se ha utilizado por sus propiedades y características similares a las de *Theobroma cacao*, puesto que se fabrica a partir de éste un chocolate de inferior calidad (FAO Forestry Department, 1986).

En estudios científicos realizados en Perú y Brasil, ya se han encontrado metabolitos secundarios presentes en *Theobroma bicolor* relacionados con la actividad antioxidante, como antocianinas, flavonoides y compuestos fenólicos. El estudio de los compuestos antioxidantes ha cobrado un gran auge por sus múltiples aplicaciones en la prevención de enfermedades y su posible utilización como antioxidantes en alimentos. Sin embargo para la especie nativa de Guatemala no se han realizado investigaciones por lo que se hace necesario evaluar la actividad antioxidante en hojas, corteza y fruto (cáscara, pulpa y semillas) para validar su actividad antioxidante en nuestra región y compararla con los resultados obtenidos de *T. bicolor* en Perú y Brasil (García, Sotero, Mancini, Pavan y Manzini, 2011).

A su vez la evaluación de la actividad citotóxica es indispensable ya que permite considerar si su uso es seguro, ya que define la toxicidad intrínseca de la planta o una posible actividad antitumoral. Es importante generar esta información porque no se cuenta con estudios que validen su seguridad y eficacia para su posible aplicación medicinal o comercial en Guatemala.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

Evaluar la actividad citotóxica y comprobar la actividad antioxidante de hojas, corteza y fruto (cáscara, pulpa y semillas) de *Theobroma bicolor* procedente de Samayac, Suchitepéquez. , para generar información que permita determinar su potencial medicinal.

### 5.2 Específicos

- 5.2.1 Comprobar la actividad antioxidante de extractos de hojas, corteza y fruto (cáscara, pulpa y semilla) de *T. bicolor* mediante cuatro pruebas espectrofotométricas.
- 5.2.2 Comprobar la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas en hojas, corteza y fruto (cáscara, pulpa y semilla) de *T. bicolor* relacionados con su actividad antioxidante por medio de cuatro pruebas espectrofotométricas.
- 5.2.3 Comprobar la presencia de taninos, alcaloides y aceites esenciales mediante pruebas macro y semimicro.
- 5.2.4 Determinar la concentración media inhibitoria de los extractos vegetales activos para comprobar su potencial antioxidante.
- 5.2.5 Comprobar el potencial antioxidante de los extractos vegetales activos con la determinación de concentración mínima inhibitoria.
- 5.2.6 Evaluar la actividad citotóxica de extractos de hojas, corteza y fruto (cáscara, pulpa y semilla) de *T. bicolor*, que presente actividad antioxidante.

## 6. HIPÓTESIS

Los extractos de hojas, corteza y fruto (cáscara, pulpa y semillas) de *Theobroma bicolor* procedentes de Samayac, Suchitepéquez presentan actividad antioxidante similar a la reportada en investigaciones científicas realizadas con *T. bicolor* no originario de Guatemala y dicha actividad se relaciona con compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas, además los extractos no presentan actividad citotóxica.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Universo de trabajo

- 7.1.1 Población: Árboles de *Theobroma bicolor* procedentes de la Ecoparcela "El Kakawatal", Samayac, Suchitepéquez.
- 7.1.2 Muestra: Se recolectaron hojas (1 kg en muestras secas), corteza (1 kg en muestras secas) y fruto (cáscara, pulpa y semillas) procedentes de ocho frutos *Theobroma bicolor*.

### 7.2 Materiales

7.2.1 Recursos Humanos:

Investigadora: Libny Judith Pernillo Hidalgo

Asesor: Dra. Sully Cruz Velásquez

7.2.2 Recursos Materiales:

a) Reactivos

- Terc-butilhidroquinona (TBHQ)
- 1,1-Difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH)
- Metanol
- Acetato de sodio
- Ácido acético glacial
- Trolox
- Vitamina C
- 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico) (ABTS)
- Persulfato de potasio
- Etanol
- Buffer de fosfato de potasio
- Ferricianuro de Potasio ( $K_3Fe(CN)_6$ )
- Ácido Tricloroacético

b) Cristalería común de laboratorio

c) Equipo

- Rotavapor
- Percolador de acero inoxidable
- Sonicator
- Agitador

- Incubadora VWR MODELO 1525
- Espectrofotómetro UV/VIS Agilent 8453 G1103A
- Lector de placas
- Baño de maría

### 7.3 MÉTODOS

- 7.3.1 Se realizó una revisión bibliográfica sobre *Theobroma bicolor* y descripción de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antioxidante.
- 7.3.2 Se realizó la recolección de la planta en Samayac, Suchitepéquez. Se obtuvieron muestras de hojas, corteza y fruto representativas de 1 kg.
- 7.3.3 Se depositaron muestras recolectadas de hojas, flores y fruto de *T. bicolor* en Herbario BIGU para su caracterización botánica.
- 7.3.4 Se realizó la extracción manual de la pulpa de frutos de *Theobroma bicolor* y maceración en etanol de ésta.
- 7.3.5 Se realizó:
- Desecado de hojas, corteza y cáscara del fruto de *T. bicolor*, con calor artificial entre 30 y 40°C.
  - Molienda de hojas por medio de tamices de cedazo de 3-5 mm y molienda con licuadora y procesador de corteza y cáscara del fruto de *T. bicolor*. La humedad residual no fue mayor del 10%
  - Desecado de las semillas de *T. bicolor* con calor artificial entre 30 y 40°C, la humedad residual no fue mayor del 10%. Molienda de semillas.
- 7.3.6 Se obtuvieron extractos diclorometánicos, hexánicos, acetato de etilo y etanólicos de hojas, corteza y semillas de *T. bicolor* con extracción fraccionada por el método de percolación y concentración por destilación a presión reducida (Tení, D., 2008)

Extracción fraccionada:

Preparación de la Planta:

- Se pesaron 200 gramos de material vegetal.
- Se colocó la droga vegetal previamente molida dentro de un recipiente resistente al disolvente a utilizar.
- Se añadió la cantidad necesaria de disolvente para remojar la planta antes de colocarla en el percolador.
- Se dejó reposar 24 horas.

#### Preparación del percolador:

- Se lavó y secó el percolador a utilizar.
- Se colocó una porción de algodón en la parte inferior del percolador.
- Se colocó sobre el algodón un pedazo de papel filtro en forma de cono.
- Se colocó dentro del percolador la planta molida y empapada según el inciso anterior.
- Se agregó el mismo disolvente para completar el volumen que sature completamente la materia vegetal (disolvente apolar).
- Se agitó suavemente para acomodar la planta.
- Se tapó el percolador y se dejó reposar 24 horas.

#### Recuperación y concentración del extracto:

- Se abrió la llave del percolador con un goteo intermedio y se recibió en un recipiente adecuado o directamente en el balón de concentración del rotavapor.
- Se colocó el balón de concentración en el rotavapor.
- Se marcó la temperatura y presión adecuadas según el disolvente.
- Se accionó el rotavapor, el disolvente recuperado se agregó de nuevo al percolador y se repitió el proceso anterior. Se desarrolló la extracción exhaustiva hasta que el efluente obtenido tuvo un color constante o incoloro.
- Se agregó el segundo disolvente más polar y se repitió el proceso anterior.
- Se trabajó de la misma forma con todos los disolventes a utilizar y se identificaron las fracciones obtenidas según solvente utilizado.

#### Concentración usando rotavapor:

- Se verificó que estuvieran conectadas todas las conexiones eléctricas.
- Se aplicó vaselina al vástago rotatorio, a todas las llaves y juntas esmeriladas
- Se colocó el balón colector y se fijó con la llave respectiva.
- Se revisó el nivel de agua del baño de calentamiento.
- Se encendió el baño y la temperatura se mantuvo entre 30-40°C
- Se colocó el balón con la muestra y se sujetó el vástago con la llave correspondiente, se encendió el botón que permite girar el balón que contiene la muestra a una revolución adecuada.
- Se conectó un sistema de enfriamiento para el refrigerante.
- Se encendió la bomba de vacío.
- Se mantuvo el sistema de refrigeración a baja temperatura, con recambio periódicos de los hielos.

Elaboración de extractos etanólicos de pulpa y cáscara del fruto de *T. bicolor*

Pulpa:

- El extracto obtenido por maceración se concentró en rotavapor y se obtuvo una fracción.

Cáscara:

- Se realizó la preparación de la cáscara
- Se realizó la preparación del percolador como se indicó anteriormente.
- Se realizó la recuperación y concentración del extracto etanólico en rotavapor. Se obtuvo una fracción.

7.3.7 Determinación macrométrica de flavonoides, antocianinas, taninos, aceites esenciales y alcaloides

**7.3.7.1 Determinación de Flavonoides y Antocianinas (Gudiel, L., 2009):**

▪ **Ensayo macro y semi-micro:**

Se disolvieron 3g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregaron 15 ml de éter de petróleo hasta que la extracción incolora. Se disolvió el residuo en 30 ml de metanol al 80 por ciento, se filtró y se dividió en 5 tubos:

Tubo 1: Se agregó 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado.

Tubo 2: Se agregó 3 a 5 gotas de cloruro férrico al 10 por ciento (p/v).

Tubo 3: Se agregó 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y se calentó en baño de maría por 5 minutos (prueba para leucoantocianinas).

Tubo 4: Se agregó magnesio metálico y 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Tubo 5: Testigo.

Reacciones: Cambios de color y/o formación de precipitado comparados con el testigo. Desarrollo inmediato de color flavonas y flavonoles (amarillo a rojo), flavanoles (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo), isoflavononas, chalconas y auronas no dan coloración.

▪ **Ensayo en cromatografía de capa fina:**

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en cromatoplaca.

Solución estándar: Se preparar una solución 0.05 por ciento en metanol y cerca de 10 µL se utilizaron para cromatografía. El límite de detección para flavonoides es de 5 a 10 µg.

Fase móvil: n-butanol: ácido acético glacial: agua (40:10:50 ó 20:5:25)

Fase Estacionaria: Silica gel cromatofolios de aluminio de 60 F264

Detección: Spray revelador: Reactivo de productos naturales (NP/PEG). Un típico color fluorescente intenso en UV-365 nm es producido inmediatamente al agregar el revelador, o después de 15 minutos. La adición de propilenglicol disminuye el límite de detección de 10 µg a 0.5 µg. (NP: Solución metanólica al 1% de difenilboriloxietilamina. PEG; Solución etanólica al 5% de polietilenglicol 4000). Aplicar a la placa vapores de amoniaco para intensificar el color de las manchas.

#### **7.3.7.2 Determinación de taninos (Gudiel, L., 2009)**

##### ▪ **Ensayo macro y semi-micro:**

Se disolvió 1g de extracto seco vegetal con etanol al 50% y se evaporó a sequedad. Se añadió 25 ml de agua caliente al residuo, se agitó con varilla y se dejó enfriar. Se agregó 1 mL de solución de cloruro de sodio al 10 por ciento y se filtró. Se adicionó 3 mL del filtrado a 4 tubos de ensayo:

Tubo 1: testigo.

Tubo 2: agregar 4 a 5 gotas de solución de gelatina al 1%

Tubo 3: agregar 4 a 5 gotas de gelatina-sal (1% de gelatina + cloruro de sodio al 10%).

Tubo 4: agregar 3 a 4 gotas de solución de cloruro férrico al 10%

Reacciones: Formación de precipitado y/o cambio de coloración.

##### ▪ **Cromatografía en Capa Fina (CCF)**

Se extrajo 1 gramo de muestra con 5 mL de etanol al 95%, macerando por 5 min. Se filtró y se concentró en baño de maría (60°C).

Estándar: Solución de taninos 1%.

Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (17:2:2:5).

Detección:

Sin tratamiento químico: Luz UV 254 nm, todos los compuestos que contienen por lo menos dos dobles enlaces conjugados fluorescen. Bajo luz UV a 365 nm el metil- antranilato muestra intensa fluorescencia azul.

Con tratamiento químico: FeCl<sub>3</sub> 10%

### 7.3.7.3 Determinación de aceites volátiles

#### Identificación por CCF

Se extrajo 1 g de material vegetal pulverizado con 10 mL de diclorometano agitando por 15 minutos. Se filtró y se evaporó en baño maría (60°C) a sequedad. Se disolvió en 1 mL de tolueno y se aplicaron 20 a 50 µL sobre la cromatoplaque de silicagel 60 F<sub>254</sub>.

Estándar: Solución de tolueno 1:30 de mentol, timol, anisaldehído, anetol, 1,8-cineol (3µL)

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7).

Detección:

Sin tratamiento químico: Luz UV 254 nm, todos los compuestos que contienen por lo menos dos dobles enlaces conjugados fluorescen.

Con tratamiento químico: Vainillina-ácido sulfúrico.

- Solución I: Ácido sulfúrico al 5% en etanol.
- Solución II: Vainillina al 1% en etanol.

Se asperjó vigorosamente la placa con la solución I, e inmediatamente con la solución II. Después se calentó a 110°C durante 5 – 10 minutos, se evaluó la placa en visible. Coloraciones en visible varían entre azul intenso, verde, rojo y café.

### 7.3.7.3 Determinación de Alcaloides (Gudiel, L., 2009)

#### • Ensayo macrométrico:

Se disolvió 1 g de extracto seco vegetal con etanol al 50%. Se agregó 2 gotas de solución de hidróxido de amonio al 10 por ciento (p/v), luego se añadió 25 mL de metanol a 60°C. Se filtró con papel filtro Whatman 1 y se acidificó el filtrado con ácido clorhídrico 2 N. La solución resultante se dividió en 4 tubos y se evaluó de la siguiente manera:

Tubo 1: Se agregó 5 gotas del reactivo de Mayer's. (Color blanco a crema).

Tubo 2: Se agregó 5 gotas del reactivo de Dragendorff. (Color rojo a naranja).

Tubo 3: Se agregó 5 gotas del reactivo de Wagner. (Color marrón).

Tubo 4: Testigo.

Estándares: Soluciones al 1% de atropina y papaverina. Se observó durante 2 horas la existencia de precipitados, turbidez o precipitación de complejos en los tubos.

▪ **Cromatografía en capa fina:**

Se concentró 1ml de extracto vegetal y se aplicó en cromatoplaca.

Estándar: Solución de atropina y papaverina al 1 por ciento en metanol (10µL).

Fase móvil: Acetato de etilo, metanol, agua (100:13.5:10), tolueno-acetato de etilodietilamina (70:20:10), n-butanol-ácido acético-agua (4:1:1).

Detección: Sin tratamiento químico: UV 254nm fluorescencia, UV 365 nm algunos fluorescen azul o amarillo. Reactivo de Dragendorff: zonas café o naranjas en región visible, los colores no son estables, presentan un tiempo de estabilidad menor a 30 minutos.

**7.3.8 Evaluación de la actividad antioxidante:**

**7.3.8.1 Determinación de la actividad antioxidante mediante la prueba de DPPH:**

▪ **Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía de capa fina mediante la prueba de DPPH (Gudiel, L., 2009; Marroquín, N., 2011):**

Se extrajo el material vegetal con metanol, se filtró y aplicó en cromatoplasmas de sílica gel 60F254 10µl de muestra y 5µl del estándar antioxidante terc-butilhidroquinona (TBHQ) realizando la detección con el reactivo difenilpicrilhidrazilo (DPPH) (que actúa como revelador).

Resultado positivo: Existió decoloración del DPPH en las bandas respectivas (Marroquín, N., 2011).

▪ **Determinación de la actividad antioxidante por espectrofotometría UV-VIS mediante la prueba de DPPH (Gudiel, L., 2009; Marroquín, N., 2011):**

a) **Preparación de solución madre:** Pesar 20mg de extracto seco y agregar 1ml de metanol absoluto luego introducirlo en el sonificador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre preparar una serie de diluciones:

No.	Muestra (μL)	Metanol (μL)	Dilución	Concentración (mg/mL)
D-1	50	200	0.2	4
D-2	100	150	0.4	8
D-3	150	100	0.6	12
D-4	200	50	0.8	16
D-5	250	----	1	20

- b) Solución de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) 150μM en metanol:** Se pesó 1.7mg de reactivo de DPPH y se disolvió con metanol hasta un volumen de 25ml en un balón aforado. Se agitó la solución y se conservó en un recipiente ámbar. Por ser una solución inestable, se recomienda preparar la solución en mismo día que se va a emplear, preparando únicamente lo necesario.
- c) Preparación de los pozos de reacción:** Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos a utilizar deben ser nuevos. La preparación de las placas se realizó bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz.

Se preparó una serie de pozos que contienen los reactivos que se citan a continuación (todas las mediciones de volumen se realizaron con pipetas automáticas):

Reactivo Pozo	Muestra	Metanol	Solución de DPPH (150μM)
Blanco Control	---	220 μL	---
Control	---	20 μL	200 μL
Blanco de Ensayo	20 μL	200 μL	---
Ensayo	20 μL	---	200 μL

Se preparan los pozos de reacción según como se indica en el inciso "C", la microplaca se agitó en un vortex para placas durante 30 segundos y luego se incubó a temperatura ambiente protegidos de la luz durante 30 minutos. Se lee en lector de microplacas de 96 pozos a una longitud de onda de 490 nm.

Para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los pozos de reacción se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del ensayo}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ Inhibición}$$

- Absorbancia del control = Absorbancia del Control – Absorbancia del Blanco Control
- Absorbancia del ensayo = Absorbancia del Ensayo – Absorbancia del Blanco respectivo

Luego con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de cada dilución se elaboró una gráfica lineal; esperando que valores de porcentaje de inhibición se encuentren entre el 60-70%. La ecuación de la recta debe tener un  $r^2$  entre 0.97-0.99, para que la corrida sea aceptada. Si no se cumplía con un porcentaje de inhibición ente 60-70% y un  $r^2$  entre 0.97-0.99, se realiza la repetición del ensayo preparando otras diluciones (si la muestra está muy concentrada) y controlando el pipeteo para mejorar el  $r^2$ .

Ya con una buena ecuación de regresión lineal se determina la concentración inhibitoria media, según la siguiente formula:

$$IC_{50}: \frac{50\% - \text{pendiente}}{\text{Intersecto}}$$

#### 7.3.8.2 Método FRAP por espectrofotometría UV-Visible (Bahr P. y Basulto, Y., 2004):

- a) **Preparación de la solución madre del extracto:** Se pesó 20 mg de extracto seco y se agregó 1mL de metanol luego se introdujo en el sonificador por 30 minutos. De esta solución madre se prepararon una serie de diluciones:

No.	Muestra (μL)	Metanol (μL)	Dilución	Concentración (mg/mL)
D-1	50	200	0.2	4
D-2	100	150	0.4	8
D-3	150	100	0.6	12
D-4	200	50	0.8	16
D-5	250	-----	1	20

- b) **Preparación de la solución madre de los estándares y diluciones:** Esto depende de cada uno de los estándares. Preparar solución madre y diluciones según se indica en el cuadro siguiente:

Estándar	Solución madre	No.	Dilución	Concentración (mg/mL)
Vitamina C	20mg/1mL MetOH	D-1	5μl/5mL MetOH	0.02
		D-2	15μl/5mL MetOH	0.06
		D-3	25μl/5mL MetOH	0.10
		D-4	35μl/5mL MetOH	0.14
		D-5	45μl/5mL MetOH	0.18

Quercetina	2mg/1mL MetOH	D-1	20µl/5mL MetOH	0.008
		D-2	60µl/5mL MetOH	0.024
		D-3	100µl/5mL MetOH	0.040
		D-4	140µl/5mL MetOH	0.056
		D-5	180µl/5mL MetOH	0.072
Rutina	20 mg/1mL MetOH	D-1	20µl/5mL MetOH	0.08
		D-2	40µl/5mL MetOH	0.16
		D-3	60µl/5mL MetOH	0.24
		D-4	80µl/5mL MetOH	0.32
		D-5	100µl/5mL MetOH	0.40
Trolox	10mg/5mL MetOH	D-1	100µl/5mL MetOH	0.04
		D-2	250µl/5mL MetOH	0.10
		D-3	400µl/5mL MetOH	0.16
		D-4	550µl/5mL MetOH	0.22
		D-5	700µl/5mL MetOH	0.28

**c) Preparación de las soluciones para solución FRAP:**

- Cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) 1%: Se pesó 1 g de cloruro férrico y se disolvió con agua desmineralizada en un balón aforado de 100 mL.
- Ferrocianuro de potasio 1%: Se pesó 1 g de ferrocianuro de potasio y se disolvió con agua desmineralizada en un balón aforado de 100 mL.
- Buffer de acetato pH 3.6: Se tomó 5.78 mL de ácido acético y se disolvió con agua desmineralizada en un balón de 500 mL. Se pesó 2.72 g acetato de sodio y se disolvió con agua desmineralizada en un balón aforado de 100 mL. En un balón aforado de 500 mL se disolvieron las soluciones de la siguiente manera:

Solución de ácido acético      231.5 mL

Solución de acetato de sodio    18.5 mL

Agua desmineralizada            250.0 mL

- d) Solución FRAP:** Se mezclaron 1.5 mL de FeCl<sub>3</sub> 1%, 1 mL de ferrocianuro de potasio 1% y 15 mL de buffer de acetato pH 3.6. Se agitó e incubó a 37°C durante 20 minutos.

- e) Preparación de los estándares y muestras para ser analizados:** Se mezclaron 1 mL de cada estándar/muestra con 1 mL de ácido tricloroacético al 10% (10 g de ácido tricloroacético disuelto con agua desmineralizada en un balón aforado de 100 mL). Se mezcló 10 segundos en el vortex y luego se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.

- f) Preparación de los pozos de reacción:** Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos a utilizar deben ser nuevos. La preparación de las placas se realizó bajo luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar los estándares.

Se prepara una serie de pozos que contienen los reactivos que se citan a continuación (todas las mediciones de volumen se realizan con pipetas automáticas):

Reactivo Pozo	Estándar	Agua	Solución FRAP
Blanco de Ensayo	-----	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Estándar	50 $\mu$ L	-----	100 $\mu$ L
Muestra	50 $\mu$ L	-----	100 $\mu$ L

Se dejó reposar durante 60 minutos. Luego se leyó en el lector de placas ELISA a 630 nm. Si hubiera formación de precipitado, se agita en el vortex cuidadosamente.

### 7.3.8.3 Método ABTS por espectrofotometría UV-Visible (Marroquín, N., 2011):

- a) **Preparación de la solución madre:** Se pesó 0.1 g de extracto seco y se agregó 5 mL de metanol absoluto, luego se introdujo en el sonificador durante 30 minutos para obtener la solución madre. De esta solución madre se prepararon las diluciones que en el método de DPPH por espectrofotometría UV-visible presentaron un porcentaje de inhibición entre 60-70% con un  $r^2$  0.97-0.99.
- b) **Preparación de la solución 2,2'azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolin 6-ásulfónico) (ABTS<sup>+</sup>) 7 mM en agua:** Se pesó 38.41 mg y se disolvió en 10 mL de agua desmineralizada.
- c) **Preparación de persulfato de potasio 2.45 mM en agua:** Se pesó 3.31 mg y se disolvió en 5 mL de agua desmineralizada.
- d) **Preparación del catión ABTS<sup>+</sup>:** Se produjo por la reacción de la solución stock de ABTS con el persulfato de potasio en una proporción 2:1. Se dejó la mezcla en un lugar oscuro al menos 16-18 horas a temperatura ambiente antes de su uso. Se preparó un día antes de realizar la prueba.
- e) **Preparación de la solución de uso:** La solución ABTS<sup>+</sup> se diluyó con etanol hasta lograr una absorbancia  $0.70 \pm 0.02$  a 734 nm y equilibrado a 30°C. Se empleó una solución 1/30 a 1/35 para obtener dicha absorbancia.
- f) **Preparación de los tubos de reacción:** Se utilizaron tubos de vidrio con capacidad de 10 mL. Se recubrieron los tubos completamente con papel aluminio para proteger de la luz la reacción. Se prepararon una serie de tubos con los reactivos que se citan a continuación:

Reactivo	Control	Ensayo
Solución ABTS <sup>+</sup>	3 mL	3 mL
Muestra	-----	30 L

Cada tubo de ensayo de cada dilución de muestra se preparo por triplicado, el blanco de la corrida es etanol al 95%. Tanto la solución ABTS como la muestra estuvieron en la incubadora a 30°C mínimo 30 minutos antes de mezclarlos. La lectura de la absorbancia se tomó a 30°C exactamente un minuto después de la mezcla inicial, al cuarto minuto y al minuto seis.

Para calcular el porcentaje de inhibición de cada uno de los pozos de reacción se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia de la dilución}}{\text{Absorbancia del control}} * 100 = \% \text{ Inhibición}$$

Luego con los valores de porcentaje de inhibición y concentración de cada dilución se elaboró una gráfica lineal; esperando que valores de porcentaje de inhibición se encuentren entre el 60-70%. La ecuación de la recta debe tener un  $r^2$  entre 0.97-0.99, para que la corrida sea aceptada. Si no se cumple con un porcentaje de inhibición ente 60-70% y un  $r^2$  entre 0.97-0.99, se repite el ensayo preparando otras diluciones (si la muestra está muy concentrada) y controlando el pipeteo para mejorar el  $r^2$ .

Ya con una buena ecuación de regresión lineal se determinó la concentración inhibitoria media, según la siguiente formula:

$$IC_{50}: \frac{50\% - \text{pendiente}}{\text{Intersecto}}$$

#### 7.3.8.4 Determinación de los compuestos fenólicos (Marroquín, N., 2016):

- a) **Preparación de solución madre:** Se pesó 20mg de extracto seco y se agregó 1ml de metanol absoluto luego introdujo en el sonificador por 30 minutos, para obtener la solución madre. De esta solución madre se preparó la primera dilución de la curva de calibración obtenida en el método de DPPH por espectrofotometría UV-visible.
- b) **Preparación de solución de Carbonato de sodio 2%:** Se disolvieron completamente 2 gramos de carbonato de sodio en 100 mL de Agua Desmineralizada.
- c) **Preparación de los pozos de reacción:** Se utilizaron microplacas de 96 pozos de fondo plano. Los pozos a utilizar deben ser nuevos. La preparación de las placas se realizó bajo

luz indirecta, tratando de proteger la reacción de la luz, la cual puede degradar los estándares.

Se preparó una serie de pozos que contienen los reactivos que se citan a continuación (todas las mediciones de volumen se realizan con pipetas automáticas):

Pozo \ Reactivo	Agua	Muestra	Reactivo de Folin-Ciocalteu	Solución Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 2%
Blanco de Ensayo	25 µL	-----	50 µL	200 µL
Muestra	-----	25 µL	50 µL	200 µL

Luego se incubó durante dos horas a temperatura ambiente. La placa se leyó en un lector de placas ELISA a 630 nm. Si hubiera formación de precipitado, agitar en el vortex cuidadosamente.

*Cálculos:*

Se obtuvo la media de las absorbancias de la muestra.

Se determinó la concentración de la muestra utilizando la ecuación de la línea recta, despejando "x".

Se utilizó el resultado obtenido para calcular los µg equivalentes de ácido gálico / mg peso seco. Realizar el cálculo de la siguiente forma:

**µg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto =**

= [(Concentración obtenida en base a la curva/0.05)\*(peso alícuota/volumen reconstitución)\*1000]\*Dilución

**Concentración en base a la curva:** Absorbancia – Intersecto/Pendiente

**µg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto seco =**

=[(µg equivalentes de ácido gálico/ g de extracto)\* (1/1-% Humedad de extracto seco)]

#### 7.3.8.5 Evaluación de la actividad citotóxica (Cáceres et al., 2006; Cruz, S., 2001):

- Cultivo de Artemia salina:** Se colocó en un vaso de precipitar 200 mL de agua de mar y se aireó por 30 minutos. Los nauplios de no más de 18h de nacimiento fueron utilizados para la prueba de toxicidad.
- Determinación de la Citotoxicidad:** Se pesaron 0.040 g del extracto a ensayar y se disolvieron con 2 mL de agua de mar. Se agregaron por triplicado en una microplaca: 100 µl del extracto disuelto + 100 µl de agua de mar con 10-15 nauplios.

Al final cada pocillo debía contener: la cantidad de  $\mu\text{l}$  de la solución de muestra según su dilución + 100  $\mu\text{l}$  de agua de mar con 10 nauplios + los  $\mu\text{l}$  suficientes para completar un volumen de 200  $\mu\text{l}$  por pozo. Con sus respectivas repeticiones (triplicado).

Si el extracto muestra actividad, si mata al 100% de nauplios, realizar diluciones de la concentración inicial.

Diluciones:

Solución a ensayar	Diluciones ( $\mu\text{l}$ )	Concentración de las diluciones (ppm)
Muestra	12	1.5
	5	0.625
	2	0.025

\*ppm=  $\mu\text{g/L}$

### c) Controles

Control negativo para cada tratamiento	100 $\mu\text{l}$ de agua de mar + 100 $\mu\text{l}$ de agua de mar con 10 nauplios. Se agrega metanol a los pozos, se espera 15 minutos y se cuentan de nuevo todos los nauplios.
Control positivo para extractos	100 $\mu\text{l}$ de alguna sustancia de actividad citotóxica reconocida. Puede utilizarse algún extracto que muestre actividad en estudios previos u otros + 100 $\mu\text{l}$ de agua de mar con 10-15 nauplios.
Control de disolventes utilizados en la elaboración de las soluciones de extractos.	Controles con los solventes utilizados para disolver las respectivas muestras a analizar.

### d) Incubado

Se incubó la microplaca (nauplios + muestra a ensayar) a temperatura ambiente con luz artificial por 24 horas.

Pasadas las 24 horas, se contó en el estereoscopio o con lupa el número de nauplios muertos.

Si se observan nauplios muertos en el control negativo la prueba no es válida y hay que repetirla.

### e) Determinación de la Citotoxicidad

- **Calculo del % de nauplios muertos:**
- Se sumó el número de nauplios muertos en los tres pozos (X)
- Se sumó el número total de nauplios en los tres pozos (Y)
- Se dividie X dentro de Y y multiplicarlos por 100.

Si el % de nauplios muertos es mayor del 50%, se repite la prueba utilizando dosis de 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL. Si el % es menor del 50% la citotoxicidad es mayor de 1 mg/mL

#### f) Cálculo de Dosis Letal media (DL<sub>50</sub>) con Statgraphics

La relación del número de nauplios muertos sobre total de expuestos se utiliza para calcular la Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) y sus intervalos de confianza al 95% por medio del modelo estadístico de regresión lineal Probit, con el programa StatGraphics Plus para Windows 5.1. (Fuentes, A., 2012)

#### 7.3.9 Diseño estadístico:

Se realizó un estudio tipo descriptivo de extractos de *Theobroma bicolor*: etanólico, hexánico, diclorometánico, y de acetato de etilo, de: hojas, corteza y semillas, así mismo de extractos etanólicos de cáscara y pulpa del fruto. La investigación se dividió en dos fases: 1) Comprobación de la Actividad Antioxidante y 2) Evaluación de su actividad citotóxica. En la comprobación de la actividad antioxidante en *T. bicolor*, se realizó un tamizaje para determinar ausencia o presencia de la actividad antioxidante por medio de cromatografía en capa fina de los extractos de hojas, corteza y fruto (cáscara, pulpa y semillas).

El análisis cuantitativo de la actividad antioxidante, se realizó en los extractos que presentaron actividad significativa en el tamizaje; se realizaron 5 diluciones:

Extracto (solución madre)	Metanol	Dilución
1 ml	4 ml	0.2
2 ml	3 ml	0.4
3 ml	2 ml	0.6
4 ml	1 ml	0.8
5 ml	0 ml	1.0

\*Realizar 3 repeticiones para cada dilución.

El análisis de los resultados se realizó por diagramas de dispersión, para determinar si el comportamiento de los resultados es lineal o no. Debido al comportamiento es lineal se realizó una regresión lineal, se determinó el coeficiente de determinación ( $r^2$ , que debe ser lo más cercano a 1) y prueba de significancia por medio de análisis de varianza para evaluar la bondad del ajuste del método. Si el comportamiento es no lineal, el análisis a realizar es no lineal, según el modelo que mejor se ajuste a los datos y se evalúa de igual manera.

Para cada caso se calcula la CI 50%, con un intervalo de confianza del 95%, utilizando las ecuaciones correspondientes.

Se realizó una comparación descriptiva de los resultados en las evaluaciones de actividad antioxidante obtenidas en el extranjero vrs los resultados de actividad antioxidante en fruto, ya que estas investigaciones se centran en semillas y pulpa, utilizando otra metodología de extracción y análisis.

#### Actividad citotóxica

Evaluación: Se prueba una solución del extracto en agua de mar, con tres repeticiones.

Ho:  $p = 0.5$  ("Ausencia de actividad citotóxica")

Ha:  $p > 0.5$  ("Presencia de actividad citotóxica")

En la investigación se comprobó la ausencia de actividad citotóxica, por lo que se acepta Ho ( $\alpha = 0.05$ ) las 3 réplicas presentan actividad citotóxica.

En caso de no rechazo de Ho se determina la dosis letal media (DL50), haciendo diluciones seriadas a partir de la concentración inicial. Análisis: Si en las tres repeticiones iniciales se observa el 100% de mortandad de nauplios, se procederá a realizar las diluciones.

## 8. RESULTADOS

**Tabla 1. Análisis químico proximal del fruto de *Theobroma bicolor* (Pulpa y semillas).** En la siguiente Tabla se observan los resultados de materia seca total, agua, grasas, fibra, proteína y carbohidratos obtenidos a partir del fruto sin cáscara de *Theobroma bicolor*. Los frutos analizados contienen en mayor proporción agua, carbohidratos, proteína cruda y grasas.

<b>Parámetro</b>	<b>Base seca</b>
<i>Agua</i>	70.10 %
<i>Materia seca total</i>	29.90 %
<i>Extracto etéreo (grasas)</i>	17.15 %
<i>Fibra cruda</i>	9.86 %
<i>Proteína cruda</i>	19.50 %
<i>Cenizas</i>	6.13 %
<i>Extracto libre de nitrógeno (carbohidratos)</i>	47.35 %

Fuente: Laboratorio de Bromatología, Universidad de San Carlos de Guatemala. (Ver Anexo 3)

**Tabla 2. Porcentajes de rendimiento obtenidos por extracción fraccionada de *Theobroma bicolor*.** En la Tabla No. 2 se encuentran los porcentajes de rendimiento obtenidos de hoja, corteza y semillas mediante extracción fraccionada con cuatro solventes extractores de polaridad creciente (Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol). La extracción fue realizada por medio de percolación y posterior concentración en rotavapor. Los extractos con mayores porcentajes de rendimiento fueron los etanólicos y los extractos con menores porcentajes fueron los de Acetato de Etilo.

<i>Muestra</i>	<i>Solvente</i>	<i>Porcentaje de rendimiento</i>
<i>Hoja</i>	<i>Hexano</i>	1.63 %
	<i>Diclorometano</i>	0.98 %
	<i>Acetato de Etilo</i>	0.66 %
	<i>Etanol 70%</i>	33.29 %
<i>Corteza</i>	<i>Hexano</i>	0.28 %
	<i>Diclorometano</i>	0.31 %
	<i>Acetato de Etilo</i>	0.28 %
	<i>Etanol 50%</i>	23.56 %
<i>Semilla</i>	<i>Hexano</i>	9.18 %
	<i>Diclorometano</i>	15.21 %
	<i>Acetato de Etilo</i>	4.37 %
	<i>Etanol 50%</i>	16.64 %
<i>Pulpa</i>	<i>Etanol 95%</i>	26.09 %
<i>Cáscara</i>	<i>Etanol 50%</i>	19.84 %

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC. (Ver Anexo 4)

**Tabla 3. Determinación macrométrica de alcaloides.** En la Tabla 3 se puede observar que las pruebas en tubo indican la ausencia de alcaloides en extractos etanólicos de hoja, corteza y pulpa, así como en los hexánicos, diclorometánicos y de acetato de etilo de semillas. Los extractos fueron evaluados con los reactivos de Mayer's, Dragendorff y Wagner.

	<b>Extracto</b>	<b>Mayer's</b>	<b>Dragendorff</b>	<b>Wagner</b>	<b>Resultado</b>
<b>HOJA</b>	Hexano	Cambio de color y ppt	Turbidez	Turbidez	<b>Positivo</b>
	Diclorometano	Presencia de ppt	Presencia de ppt	Presencia de ppt	<b>Positivo</b>
	Acetato de etilo	Turbidez	Turbidez	Turbidez	<b>Positivo</b>
	Etanol	-	-	-	Negativo
<b>CORTEZA</b>	Hexano	Turbidez	Turbidez	Turbidez	<b>Positivo</b>
	Diclorometano	Turbidez	Turbidez	Turbidez	<b>Positivo</b>
	Acetato de etilo	Turbidez	Turbidez	Turbidez	<b>Positivo</b>
	Etanol	Turbidez	-	-	Negativo
<b>FRUTO</b>	Semilla Hexano	Turbidez	-	-	Negativo
	Semilla	-	-	-	Negativo
	Diclorometano				
	Semilla Acetato de etilo	-	-	-	Negativo
	Semilla Etanol	Turbidez	Turbidez	Turbidez	<b>Positivo</b>
	Pulpa Etanol	Turbidez	-	-	Negativo
	Cáscara etanol	Turbidez	Turbidez	Turbidez	<b>Positivo</b>

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT

– USAC. Interpretación: Un resultado positivo Indica la existencia de precipitados (ppt) o turbidez. (Ver

Anexo 5)

**Tabla 4. Determinación de alcaloides por medio de cromatografía en capa fina.** Los extractos obtenidos fueron evaluados mediante cromatografía en capa fina, confirmando los resultados de las pruebas en tubos. La fase móvil utilizada fue Tolueno, acetato de etilo, dietilamina (35:10:5), utilizando como reactivo revelador Dragendorff. Se observa ausencia de alcaloides en los extractos etanólicos de hoja y corteza, así como en los extractos de semilla (Hexánico, Diclorometánico y de Acetato de Etilo).

<b>Extracto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Bandas</b>	<b>RF y color</b>
<b>Hoja</b>	<i>Hexano</i>	1	0.11 – Amarillo
	<i>Diclorometano</i>	1	0.24 - Amarillo
	<i>Acetato de etilo</i>	1	0.23 - Amarillo
	<i>Etanol 70%</i>	0	-
<b>Corteza</b>	<i>Hexano</i>	1	0.22 - Amarillo
	<i>Diclorometano</i>	1	0.27 - Amarillo
	<i>Acetato de etilo</i>	0	-
	<i>Etanol 50%</i>	0	-
<b>STD</b>	<i>Papaverina</i>	1	0.58 - Amarillo
	<i>Atropina</i>	1	0.42 - Amarillo
<b>Semilla</b>	<i>Semilla Hexano</i>	0	-
	<i>Semilla</i>	0	-
	<i>Diclorometano</i>		-
	<i>Semilla Acetato de etilo</i>	0	-
	<i>Semilla Etanol 50%</i>	1	0.74 - Amarillo
<b>Pulpa</b>	<i>Pulpa Etanol 95%</i>	2	0.65 – Amarillo 0.74 - Amarillo
<b>Cáscara</b>	<i>Cáscara etanol 50%</i>	1	0.53 - Amarillo
<b>STD</b>	<i>Papaverina</i>	1	0.65 - Amarillo
	<i>Atropina</i>	1	0.39 - Amarillo

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT – USAC. En la detección con el reactivo de Dragendorff se observa la existencia de zonas naranjas en visible.

(Ver Anexo 5)

**Tabla 5. Determinación macrométrica taninos.** En la siguiente tabla puede apreciarse que las pruebas macrométricas en tubo no evidenciaron la presencia de taninos en ningún extracto de *Theobroma bicolor*. Las pruebas fueron realizadas con Gelatina 1%, Gelatina-Sal y Cloruro férrico.

	<b>Extracto</b>	<b>Gelatina 1%</b>	<b>Gelatina - sal</b>	<b>FeCl<sub>3</sub></b>	<b>Resultado</b>
<b>Hoja</b>	<i>Hexano</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Diclorometano</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Acetato de etilo</i>	-	-	<i>(+) color marrón verdoso</i>	<i>Negativo</i>
	<i>Etanol</i>	-	-	<i>(+) color marrón verdoso</i>	<i>Negativo</i>
<b>Corteza</b>	<i>Hexano</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Diclorometano</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Acetato de etilo</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Etanol</i>	-	-	<i>(+) color marrón verdoso</i>	<i>Negativo</i>
<b>Fruto</b>	<i>Semilla Hexano</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Semilla Diclorometano</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Semilla Acetato de etilo</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Semilla Etanol</i>	-	-	<i>(+) color marrón verdoso</i>	<i>Negativo</i>
	<i>Pulpa Etanol</i>	-	-	-	<i>Negativo</i>
	<i>Cáscara etanol</i>	-	-	<i>(+) color marrón verdoso</i>	<i>Negativo</i>

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT

– USAC. Interpretación: (+) Indica la formación de precipitados, y/o cambios de color con gelatina-sal y gelatina al 1%. Con FeCl<sub>3</sub> cambio a gris-negro / negro-azul. (-) sin cambios (Ver Anexo 6)

**Tabla 6. Determinación de aceites esenciales por medio de cromatografía en capa fina.** En la siguiente Tabla puede observarse la ausencia de aceites esenciales en los extractos etanólicos, evaluados mediante cromatografía en capa fina. La fase móvil utilizada fue Tolueno, acetato de etilo (93:7). La detección se realizó con vainillina-ácido sulfúrico y posterior calentamiento.

	<b>Extracto</b>	<b>Bandas</b>	<b>RF y color</b>
<b>Hoja</b>	Hexano	5	0.29 - 0.43 - 0.59 - 0.70 - 0.97 Azul - azul - morado - morado - azul
	Diclorometano	9	0.19 - 0.27 - 0.34 - 0.40 - 0.53 - 0.63 - 0.66 - 0.77 - 0.99 Verde - morado - verde - verde - morado - azul - azul - verde - azul
	Acetato de etilo	9	0.07 - 0.14 - 0.26 - 0.34 - 0.39 - 0.51 - 0.61 - 0.74 - 0.97 Azul - azul - azul - azul - verde - azul - azul - verde - azul
	Etanol	0	---
<b>Corteza</b>	Hexano	3	0.23 - 0.37 - 0.77 / Morado - morado - azul
	Diclorometano	6	0.11 - 0.20 - 0.26 - 0.36 - 0.41 - 0.89 / Azul - azul - azul - morado - azul - azul
	Acetato de etilo	7	0.07 - 0.23 - 0.41 - 0.50 - 0.60 - 0.76 - 0.87 / Azul
	Etanol	0	---
<b>Fruto</b>	Hexano	1	0.77 - Azul
	Diclorometano	1	0.76 - Azul
	Acetato de etilo	1	0.79 - Azul
	Etanol	2	0.16 - 0.99 Morado - morado
	Pulpa etanol	0	---
	Cáscara etanol	0	---
<b>ESTÁNDARES</b>	Mentol	4	0.46 - 0.59 - 0.80 - 0.99 / Azul - morado - azul - morado
	Timol	5	0.57 - 0.70 - 0.77 - 0.87 - 0.99 / Naranja - verde - verde - rosado - morado
	Anisaldehido	4	0.27 - 0.36 - 0.57 - 0.97 / Amarillo - morado - morado - morado -
	Cineol	1	0.57 - Morado
	Anetol	1	0.91 - Celeste
	Eugenol	3	0.26 - 0.40 - 0.59 / Rosa - Rosa - Rosa

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT - USAC. (Ver Anexo 7)

**Tabla 7. Determinación macrométrica de flavonoides y antocianinas.** En la siguiente tabla se pueden observar los resultados de la determinación de flavonoides en extractos obtenidos de *Theobroma bicolor* mediante pruebas cualitativas de ensayo en tubo. Se evidenció la presencia de éstos en los extractos etánicos de hoja, corteza, pulpa, cáscara y semillas.

	<b>Extracto</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>FeCl<sub>3</sub></b>	<b>HCl y calor</b>	<b>Mg metálico</b>	<b>Resultado</b>
<b>Hoja y Corteza</b>	<i>Hoja Hexano</i>	+	+	+	-	<i>Negativo</i>
	<i>Hoja Diclorometano</i>	+	+	+	-	<i>Negativo</i>
	<i>Hoja Acetato de etilo</i>	+	+	+	-	<i>Negativo</i>
	<i>Hoja Etanol</i>	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
	<i>Corteza etanol</i>	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
<b>Fruto</b>	<i>Semilla Hexano</i>	-	-	+	-	<i>Negativo</i>
	<i>Semilla Diclorometano</i>	+	-	+	-	<i>Negativo</i>
	<i>Semilla Acetato de Etilo</i>	+	-	+	-	<i>Negativo</i>
	<i>Semilla Etanol</i>	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
	<i>Pulpa Etanol</i>	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
	<i>Cáscara etanol</i>	+	+	+	+	<b>Positivo</b>
	<i>Rutina</i>	+	+	+	+	<b>Estándar</b>
	<i>Quercetina</i>	+	+	+	+	<b>Estándar</b>

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT – USAC. Interpretación: (+) Indica la formación de precipitados, burbujas y/o cambios de color. (Ver Anexo 8)

**Tabla 8. Determinación de flavonoides por medio de cromatografía en capa fina.** En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en la determinación de flavonoides mediante cromatografía en capa fina. Los extractos en donde no se evidenció la presencia de flavonoides fueron en hoja, el extracto hexánico y en semilla, los extractos hexánico, acetato de etilo y diclorometánico. La fase móvil utilizada fue acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100:11:11:27) y se realizó su detección con el Reactivo de Productos Naturales.

	<b>Extracto</b>	<b>Bandas</b>	<b>RF y color</b>
<b>Hoja</b>	Hexano	1	0.91 / Rosa
	Diclorometano	1	0.93 / Rosa
	Acetato de etilo	3	0.66 - 0.79 - 0.90 / Rosa – amarillo - azul
	Etanol	7	0.40 - 0.46 - 0.71 - 0.79 - 0.84 - 0.89 - 0.99 Azul – azul – azul – verde – amarillo – verde - rosa
<b>Corteza</b>	Hexano	0	--
	Diclorometano	1	0.29 / Azul
	Acetato de etilo	1	0.81 / Azul
	Etanol	3	0.79 - 0.87 - 0.97 / Azul – verde - azul
<b>Fruto</b>	Semilla Hexano	0	--
	Semilla Diclorometano	0	--
	Semilla Acetato de etilo	0	--
	Semilla Etanol	1	0.44 / Azul
	Pulpa etanol	2	0.40 - 0.90 / Azul – morado
	Cáscara etanol	3	0.40 - 0.93 - 0.99 / Azul – verde - amarillo
	Ácido Clorogénico	2	0.60 - 0.80 / Azul - verde
	Rutina	1	0.46 / Amarillo
	Quercetina	2	0.89 - 0.97 / Azul - amarillo

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT – USAC. (Ver Anexo 8)

**Tabla 9. Determinación de la actividad antioxidante por cromatografía en capa fina mediante la prueba de DPPH.** En la siguiente tabla se puede observar que los extractos que no presentan actividad antioxidante frente al radical DPPH son en corteza, el extracto hexánico y diclorometánico y en semilla, el extracto hexánico, acetato de etilo y diclorometánico. La fase móvil utilizada fue acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100:11:11:27) y se realizó su detección al asperjar con DPPH y observar zonas decoloradas en la cromatoplaca.

<b>Extracto</b>	<b>Solvente</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Resultado</b>
<b>Hoja</b>	<i>Hexano</i>	<i>+</i>	<i>POSITIVO</i>
	<i>Diclorometano</i>	<i>+</i>	<i>POSITIVO</i>
	<i>Acetato de etilo</i>	<i>++</i>	<i>POSITIVO</i>
	<i>Etanol 70%</i>	<i>+++</i>	<i>POSITIVO</i>
<b>Corteza</b>	<i>Hexano</i>	<i>-</i>	<i>NEGATIVO</i>
	<i>Diclorometano</i>	<i>-</i>	<i>NEGATIVO</i>
	<i>Acetato de etilo</i>	<i>++</i>	<i>POSITIVO</i>
	<i>Etanol 50%</i>	<i>++++</i>	<i>POSITIVO</i>
<b>Semillas</b>	<i>Hexano</i>	<i>-</i>	<i>NEGATIVO</i>
	<i>Diclorometano</i>	<i>-</i>	<i>NEGATIVO</i>
	<i>Acetato de etilo</i>	<i>-</i>	<i>NEGATIVO</i>
	<i>Etanol 50%</i>	<i>++</i>	<i>POSITIVO</i>
<b>Pulpa</b>	<i>Etanol 95%</i>	<i>+</i>	<i>POSITIVO</i>
<b>Cáscara</b>	<i>Etanol 50%</i>	<i>++</i>	<i>POSITIVO</i>

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT

– USAC. Interpretación: (-) sin actividad antioxidante frente a DPPH, (+) posee poca actividad, (++) posee moderada actividad, (+++) posee buena actividad, (++++) posee bastante actividad. (Ver Anexo 9)

**Tabla 10. Cuantificación de la actividad antioxidante por el método de DPPH y ABTS.** En la Tabla No. 10 se muestra la Concentración Inhibitoria Mínima de los extractos por el método DPPH y ABTS. Los resultados indican que los extractos con mayor capacidad antioxidante son los etanólicos de hoja, corteza, semillas y cáscara.

<i>Extracto</i>		<i>DPPH</i> <i>CI50</i>	<i>IC</i>	<i>ABTS</i> <i>CI50</i>	<i>IC</i>
<i>Hojas</i>	<i>Hexano</i>	$3.00 \pm 0.25$	2.874–3.126	$4.41 \pm 0.10$	4.357–4.463
	<i>Diclorometano</i>	$1.59 \pm 0$	1.588–1.592	$7.31 \pm 0.46$	7.077–7.543
	<i>Acetato de Etilo</i>	$2.82 \pm 0.11$	2.766–2.874	$2.29 \pm 0.20$	2.188–2.392
	<i>Etanol 70%</i>	<b><math>0.41 \pm 0.01</math></b>	<b>0.407–0.413</b>	<b><math>0.48 \pm 0.005</math></b>	<b>0.477–0.483</b>
<i>Corteza</i>	<i>Acetato de Etilo</i>	$2.96 \pm 0.21$	2.853–3.067	$4.85 \pm 0.11$	4.795–4.905
	<i>Etanol 50%</i>	<b><math>0.39 \pm 0.01</math></b>	<b>0.385–0.395</b>	<b><math>0.48 \pm 0.02</math></b>	<b>0.469–0.491</b>
<i>Fruto</i>	<i>Semillas Etanol 50%</i>	<b><math>1.16 \pm 0.01</math></b>	<b>0.574–1.746</b>	<b><math>1.64 \pm 0.02</math></b>	<b>1.630–1.60</b>
	<i>Pulpa Etanol 95%</i>	$13.35 \pm 0.74$	12.978–13.722	$14.80 \pm 0.29$	14.655–14.945
	<i>Cáscara Etanol 50%</i>	<b><math>1.07 \pm 0.05</math></b>	<b>1.047–1.093</b>	<b><math>1.64 \pm 0.04</math></b>	<b>1.621–1.659</b>
<i>Estándares</i>	<i>Vitamina C</i>	<b><math>0.090 \pm 0.0105</math></b>		<b><math>0.21 \pm 0.0062</math></b>	
	<i>Trolox</i>	<b><math>0.12 \pm 0.0008</math></b>		<b><math>0.30 \pm 0.0013</math></b>	
	<i>TBHQ</i>	<b><math>0.11 \pm 0.007</math></b>		<b><math>0.19 \pm 0.0062</math></b>	
	<i>Rutina</i>	<b><math>0.17 \pm 0.0062</math></b>		<b><math>0.85 \pm 0.04</math></b>	
	<i>Quercetina</i>	<b><math>0.075 \pm 0.0004</math></b>		<b><math>0.10 \pm 0.0015</math></b>	

IC = Intervalos de confianza al 95%. Se realizaron tres repeticiones para cada curva de calibración.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC. (Ver Anexo 10 y 11)

**Tabla 11. Cuantificación de la actividad antioxidante por espectrofotometría UV-VIS mediante el método de FRAP.** La actividad antioxidante también se determinó por el método de FRAP. En la tabla se muestran los moles equivalentes de estándar presentes en los extractos capaces de reducir el ion  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , siendo los extractos etanólicos los que presentan mayor actividad antioxidante.

<i>Extracto</i>	<i>Moles quercetina</i>	<i>IC</i>	<i>Moles rutina</i>	<i>IC</i>	<i>Moles sulfato ferroso</i>	<i>IC</i>	<i>Moles trolox</i>	<i>IC</i>	<i>Moles vitamina C</i>	<i>IC</i>
<b>HOJAS</b>										
<i>Hexano</i>	<i>0.01 ± 0.00</i>	<i>0.01</i>	<i>0.07 ± 0.00</i>	<i>0.067-0.073</i>	<i>0.10 ± 0.00</i>	<i>0.098-0.102</i>	<i>0.04 ± 0.00</i>	<i>0.038-0.042</i>	<i>0.04 ± 0.00</i>	<i>0.039-0.041</i>
<i>Diclorometano</i>	<i>0.02 ± 0.00</i>	<i>0.02</i>	<i>0.12 ± 0.00</i>	<i>0.115-0.125</i>	<i>0.17 ± 0.00</i>	<i>0.168-0.172</i>	<i>0.08 ± 0.00</i>	<i>0.077-0.83</i>	<i>0.07 ± 0.00</i>	<i>0.069-0.071</i>
<i>Acetato de etilo</i>	<i>0.04 ± 0.00</i>	<i>0.04</i>	<i>0.26 ± 0.01</i>	<i>0.252-0.268</i>	<i>0.36 ± 0.00</i>	<i>0.358-0.362</i>	<i>0.18 ± 0.01</i>	<i>0.173-0.187</i>	<i>0.16 ± 0.00</i>	<i>0.158-0.162</i>
<i>Etanol</i>	<b><i>0.22 ± 0.00</i></b>	<b><i>0.218-.222</i></b>	<b><i>1.40 ± 0.04</i></b>	<b><i>1.356-1.444</i></b>	<b><i>1.97 ± 0.01</i></b>	<b><i>1.961-1.979</i></b>	<b><i>0.97 ± 0.03</i></b>	<b><i>0.935-1.005</i></b>	<b><i>0.87 ± 0.01</i></b>	<b><i>0.859-0.881</i></b>
<b>CORTEZA</b>										
<i>Acetato de etilo</i>	<i>0.02 ± 0.00</i>	<i>0.02</i>	<i>0.13 ± 0.00</i>	<i>0.126-0.134</i>	<i>0.19 ± 0.00</i>	<i>0.189-0.191</i>	<i>0.09 ± 0.00</i>	<i>0.087-0.093</i>	<i>0.08 ± 0.00</i>	<i>0.079-0.081</i>
<i>Etanol</i>	<b><i>0.24 ± 0.00</i></b>	<b><i>0.036-0.516</i></b>	<b><i>1.46 ± 0.05</i></b>	<b><i>1.406-1.514</i></b>	<b><i>2.07 ± 0.02</i></b>	<b><i>2.052-2.088</i></b>	<b><i>0.99 ± 0.03</i></b>	<b><i>0.955-1.025</i></b>	<b><i>0.90 ± 0.01</i></b>	<b><i>0.890-0.910</i></b>
<b>FRUTO</b>										
<i>Etanol semillas</i>	<b><i>0.14 ± 0.00</i></b>	<b><i>0.139-10.141</i></b>	<b><i>0.85 ± 0.02</i></b>	<b><i>0.822-0.878</i></b>	<b><i>1.21 ± 0.00</i></b>	<b><i>1.204-1.216</i></b>	<b><i>0.59 ± 0.02</i></b>	<b><i>0.569-0.611</i></b>	<b><i>0.53 ± 0.01</i></b>	<b><i>0.524-0.536</i></b>
<i>Etanol pulpa</i>	<i>0.01 ± 0.00</i>	<i>0.01</i>	<i>0.07 ± 0.00</i>	<i>0.068-0.072</i>	<i>0.09 ± 0.00</i>	<i>0.089-0.091</i>	<i>0.04 ± 0.00</i>	<i>0.039-0.041</i>	<i>0.04 ± 0.00</i>	<i>0.04</i>
<i>Etanol cáscara</i>	<b><i>0.06 ± 0.00</i></b>	<b><i>0.059-0.061</i></b>	<b><i>0.37 ± 0.01</i></b>	<b><i>0.355-0.385</i></b>	<b><i>0.53 ± 0.01</i></b>	<b><i>0.523-0.537</i></b>	<b><i>0.24 ± 0.01</i></b>	<b><i>0.231-0.249</i></b>	<b><i>0.23 ± 0.00</i></b>	<b><i>0.226-0.234</i></b>

IC = Intervalos de confianza al 95%. Se realizaron tres repeticiones para cada extracto.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT – USAC. (Ver Anexo 12)

**Tabla 12. Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría UV-VIS.** En la tabla siguiente se muestra el contenido de fenoles en los extractos expresados como mg de ácido gálico por gramo de extracto. Los extractos etanólicos de hoja, corteza y semillas presentan mayor contenido de fenoles.

	<i>Extracto</i>	<i>mg de ácido gálico/g de extracto</i>	<i>IC</i>
<b>Hojas</b>	<i>Hexano</i>	<i>0.09 ± 0.00</i>	<i>0.086-0.094</i>
	<i>Diclorometano</i>	<i>0.05 ± 0.00</i>	<i>0.048-0.052</i>
	<i>Acetato de Etilo</i>	<i>0.04 ± 0.00</i>	<i>0.039-0.041</i>
	<i>Etanol 70%</i>	<b><i>0.14 ± 0.00</i></b>	<b><i>0.135-0.145</i></b>
<b>Corteza</b>	<i>Acetato de Etilo</i>	<i>0.03 ± 0.00</i>	<i>0.029-0.031</i>
	<i>Etanol 50%</i>	<b><i>0.16 ± 0.00</i></b>	<b><i>0.154-0.166</i></b>
<b>Fruto</b>	<i>Semillas Etanol 50%</i>	<b><i>0.10 ± 0.01</i></b>	<b><i>0.096-0.104</i></b>
	<i>Pulpa Etanol 95%</i>	<i>0.01 ± 0.00</i>	<i>0.01</i>
	<i>Cáscara Etanol 50%</i>	<i>0.05 ± 0.00</i>	<i>0.048-0.052</i>

IC = Intervalos de confianza al 95%. Se realizaron tres repeticiones para cada extracto.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT

– USAC. (Ver Anexo 13)

**Tabla 13. Identificación de ácidos grasos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.**

La identificación de ácidos grasos se realizó en los extractos polares y apolares de semilla, en cada extracto se logró la identificación de por lo menos cien compuestos, de los cuáles los siguientes corresponden a ácidos grasos evaluando una correspondencia mayor al 90% de cada compuesto con espectros procedentes de librerías comerciales.

	<b>No.</b>	<b>Ácido graso</b>	<b>Tiempo de retención</b>	<b>% de área</b>
<b>Extracto Semillas hexano</b>	1	Ester metílico del ácido tetradecanoico	15.44	0.106
	2	Ester metílico del ácido tridecanoico	16.60	0.043
	3	Ester metílico del ácido 7- hexadecenoico	17.43	0.076
	4	Ácido n-hexadecanoico	18.38	0.471
	5	Ester metílico del ácido heptadecanoico	18.74	0.337
	6	Ácido 2-hidroxiisocaproico	20.60, 20.70	0.099, 0.090
	7	Ester metílico del ácido cis-11-eicosenoico	21.18	0.288
	8	Ester metílico del ácido eicosanoico	21.45	2.888
	9	Ester metílico del ácido docosanoico	23.81	0.443
	10	Ester metílico del ácido 10,13-dimetil-tetradecanoico	25.46	0.100
	11	Ester metílico del ácido triacontanoico	27.52	0.239
<b>Extracto Semillas diclorometano</b>	1	Ester metílico del ácido tetradecanoico	15.47	0.091
	2	Ester metílico del ácido tridecanoico	16.63	0.045
	3	Ester metílico del ácido 9-hexadecenoico	17.46	0.052
	4	Ácido n-hexadecanoico	18.40	0.508
	5	Ester metílico del ácido heptadecanoico	18.78	0.250
	6	Ácido 3-hidroxidecanoico	21.21	0.316
	7	Ester metílico del ácido eicosanoico	21.51	1.971
	8	Ester metílico del ácido docosanoico	23.90	0.276
	9	Ester metílico del ácido triacontanoico	27.65	0.126
<b>Semillas acetato de Etilo</b>	1	Ester metílico del ácido tetradecanoico	15.44	0.068
	2	Ácido n-hexadecanoico	18.32	0.223
	3	Ester metílico del ácido heptadecanoico	18.73	0.244
	4	Ácido 3-hidroxidecanoico	21.16	0.203
	5	Ester metílico del ácido eicosanoico	21.43	2.159
	6	Ester metílico del ácido docosanoico	23.81	0.292
	7	Ester metílico del ácido 10,13-dimetil-tetradecanoico	25.45	0.215
	8	Ester metílico del ácido triacontanoico	27.53	0.437

Fuente: Datos Experimentales obtenidos en laboratorio de análisis toxicológico, USAC. (Ver Anexo 14)

**Tabla 14. Evaluación de la actividad citotóxica.** Se determinó la actividad citotóxica contra *Artemia salina* en todos los extractos obtenidos. Se observó que los extractos no presentan toxicidad mayor a 1 mg/mL.

<b>Extracto</b>	<b>Solvente</b>	<b>% de nauplios muertos</b>	<b>Citotoxicidad</b>
<b>Hojas</b>	<i>Hexano</i>	20%	> a 1 mg/mL
	<i>Diclorometano</i>	10%	> a 1 mg/mL
	<i>Acetato de Etilo</i>	13%	> a 1 mg/mL
	<i>Etanol 70%</i>	10%	> a 1 mg/mL
<b>Corteza</b>	<i>Hexano</i>	43%	> a 1 mg/mL
	<i>Diclorometano</i>	27%	> a 1 mg/mL
	<i>Acetato de Etilo</i>	17%	> a 1 mg/mL
	<i>Etanol 50%</i>	13%	> a 1 mg/mL
<b>Semilla</b>	<i>Semillas hexano</i>	13%	> a 1 mg/mL
	<i>Semillas diclorometano</i>	7%	> a 1 mg/mL
	<i>Semillas acetato de Etilo</i>	23%	> a 1 mg/mL
	<i>Semillas Etanol 50%</i>	3%	> a 1 mg/mL
<b>Pulpa</b>	<i>Etanol 95%</i>	10%	> a 1 mg/mL
<b>Cáscara</b>	<i>Etanol 50%</i>	17%	> a 1 mg/mL
<b>Controles</b>	<i>Positivo (Cloro)</i>	100%	
	<i>Negativo (Agua de mar)</i>	0%	
	<i>Negativo (Agua pura)</i>	0%	

Se realizaron tres repeticiones para cada extracto.

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT  
– USAC. (Ver Anexo 15)

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

*Theobroma bicolor* es una especie nativa de Guatemala, que se cultiva y se utiliza por sus propiedades y características similares a las del cacao, es un árbol que crece desde México hasta Brasil, y en Perú y Brasil se ha encontrado que las semillas poseen un alto potencial antioxidante. En el presente estudio se evaluó la capacidad antioxidante, citotóxica y la determinación de algunos metabolitos presentes en *Theobroma bicolor*. Se recolectaron hojas, corteza y frutos de *Theobroma bicolor* procedentes de Samayac, Suchitepéquez y se procedió al depósito de estas en el Herbario BIGU, las muestras fueron ingresadas con número de boucher 67783 (Ver anexos 1 y 2).

El análisis químico proximal proporciona información sobre el contenido o potencial nutricional de un alimento, en esta investigación se realizó al fruto y se determinó el porcentaje de proteínas, grasas, fibras, cenizas y carbohidratos de pulpa y semillas. Como se puede observar en la tabla No. 1, el contenido de humedad es muy alto, cercano al 70%, en general este fruto tiene un contenido de humedad relativamente alto. El fruto presentó 47 % de carbohidratos, similar a lo reportado por Gálvez (2016). El porcentaje de proteína que presentó (19%) es mayor al obtenido por García (2002) para semillas (13%) y por Hernández en 1998 para pulpa (12%). En relación al contenido de grasas, fue de 17% y es uno de los menores porcentajes reportados siendo comparado con especímenes de otros países, como lo es en México donde contiene hasta 50% para semillas. Cabe mencionar que la variedad utilizada, condiciones ambientales y la etapa de maduración del fruto afectan las propiedades y el contenido de grasas en semillas. El fruto de *Theobroma bicolor* posee un alto potencial nutricional debido al contenido de carbohidratos y de cenizas, un indicador del contenido de minerales (Carpenter, Hammerstone, Romanczyk y Aitken, 1994; Gálvez et al., 2016; Hernández, Casa, Martínez y Galvis, 1998; Sotelo y Álvarez, 1991).

Se realizó extracción fraccionada sucesiva con solventes de polaridad creciente en hojas, corteza y semillas de *Theobroma bicolor* para obtener a su vez compuestos de polaridad creciente, y debido a que la cáscara y pulpa representan un alto porcentaje del peso total del fruto se realizó la extracción etanólica de sus componentes para evaluar su potencial. Los extractos con mayor porcentaje de rendimiento fueron los etanólicos, siendo importante hacer notar que en hojas y corteza los porcentajes de rendimiento obtenidos con hexano, diclorometano y acetato de etilo fueron menores al 1.7%, concluyendo que existe menor cantidad de compuestos apolares en hojas y corteza. En las semillas los extractos con mayor porcentaje de rendimiento fueron el etanólico (16.63%) y el diclorometánico (15.21%). Al comparar los rendimientos obtenidos de los extractos hexánicos, diclorometánicos y acetato de etilo de hojas, corteza y semillas se observa que los porcentajes de rendimiento en semillas son mayores debido al contenido de ácidos grasos en ellas, ya que al ser compuestos apolares se logró su extracción con estos solventes; en otra investigación se obtuvo un porcentaje de rendimiento de grasas del 38% utilizando extracción con soxhlet, confirmando el alto porcentaje de grasas en esta especie (Jee, 1984). (Ver Tabla 2 y Anexo 4).

Como se puede observar en las Tablas 3 y 4, se evidenció la presencia de alcaloides en los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo en hojas y en los extractos de hexano y diclorometano de corteza. También se encontraron en los extractos etanólicos de semillas, cáscara

y pulpa del fruto. Probablemente los alcaloides presentes en estas fracciones son teobromina, teofilina, y cafeína ya que en Brasil y en México identificaron estos alcaloides en hojas, semillas y pulpa de *Theobroma bicolor*. (Hammerstone, Romanczyk, y Martin, 1994; Sotelo y Alvarez, 1991). Según Villacrés (Santizo, 2013), en corteza y raíz se encontraron taninos, en la presente investigación no se encontraron taninos en ningún extracto, sin embargo con la prueba de cloruro férrico se observó aparición de coloración marrón verdosa en hojas (fracciones etanólica y de acetato de etilo), corteza, semillas y cáscara (fracciones etanólicas), probablemente debido a que el cloruro férrico permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos, y los extractos que presentaron esta coloración presentan flavonoides y fenoles (Ver tabla 5) (Santizo, 2013)

Según los resultados de la tabla No. 6 se encontró presencia de aceites esenciales en las fracciones de hexano, diclorometano, acetato de etilo de hojas, corteza y semillas, ya que se observaron bandas con color característico para aceites esenciales. No se observó ninguna banda en las fracciones de etanol, esto debido a la naturaleza lipofílica y solubilidad en disolventes apolares de los aceites (Kuklinski, 2000). Al comparar los  $R_f$  y los colores observados de los aceites en los extractos y estándares usados, podrían estar presentes mentol, timol, anisaldehído y cineol en corteza y hojas. En los extractos de semillas podría estar presente el linalol, ya que en frutos de *Theobroma bicolor* procedentes de Colombia, se realizó un análisis de los compuestos volátiles, identificando entre otros al linalol en un 15.6% (Quijano y Pino, 2009).

Como se puede observar en las tablas 7 y 8, la mayoría de extractos presentaron flavonoides, se observaron bandas fluorescentes verde, rosa, azul y amarillo a 365 nm. Al comparar las bandas de los estándares usados con las bandas de los flavonoides detectados, se puede concluir que en los extractos no se encuentran los flavonoides rutina, ácido clorogénico y quercetina, pese a que en Perú sí se ha reportado rutina en pulpa y semilla (Sotero et al., 2011). Como también se ha reportado hiperósido e isoquercetina en pulpa y semilla, es probable que estos flavonoides estén presentes en los extractos. Los extractos que no presentaron flavonoides fueron el hexánico de corteza y en semillas el hexánico, diclorometánico y de acetato de etilo, y estos tampoco presentaron actividad antioxidante, ver Tabla 9 (Sotero et al., 2011).

La actividad antioxidante se evaluó por medio de cuatro métodos: decoloración del radical DPPH, decoloración radical ABTS, reducción férrica y fenoles totales. La capacidad se evaluó cualitativamente por medio de cromatografía en capa fina, los extractos que no presentaron actividad antioxidante fueron el hexánico y diclorometánico de corteza; el hexánico, diclorometánico y de acetato de etilo de semillas, ver Tabla 9. De los extractos que sí presentaron actividad antioxidante se procedió a realizar las pruebas cuantitativas con DPPH. Como se puede observar en la tabla 10, la actividad antioxidante se expresa como concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) lo cual corresponde a la concentración requerida por el extracto para disminuir la absorbancia del DPPH a 50 %, empleando una ecuación de la recta para cada extracto, elaborada a partir de diferentes diluciones de los mismos (Ver anexo 10). Tomando en cuenta que un  $CI_{50}$  bajo está asociado a una actividad antioxidante alta, los extractos que presentaron la mejor actividad antioxidante fueron el etanólico de hojas, corteza, cáscara y semillas con valores de 0.41, 0.39, 1.07 y 1.16 mg/ml, comparado con los estándares utilizados, que presentaron valores entre 0.12 a 0.090 mg/ml. Los estándares utilizados fueron Vitamina C, Trolox, TBHQ, Rutina y Quercetina.

Todos los extractos etanólicos presentaron mayor capacidad antioxidante que los extractos apolares y medianamente polares, con excepción del extracto etanólico de pulpa. Se puede concluir que compuestos polares son los responsables de la capacidad antioxidante obtenida. Los valores de  $CI_{50}$  observados en cáscara y semillas son muy similares entre sí, contrario a los resultados obtenidos en una investigación de Colombia donde la cáscara presentó mejor capacidad antioxidante que las semillas y pulpa. En otra investigación de Perú, encontraron que la semilla posee mejor actividad que la pulpa; esta investigación corrobora que la pulpa tiene poca actividad antioxidante frente al radical DPPH (Barrón, García, Soto, Colinas y Kite, 2011; González, Moncada, Idarraga, Rosenberg y Cardona, 2016; Sotero et al., 2011).

En el método del ABTS, la actividad antioxidante se determina por la decoloración del radical del ABTS, generado al reaccionar con persulfato de potasio y midiendo espectrofotométricamente la reducción del radical al reaccionar con compuestos antioxidantes (Moon y Shibamoto, 2009). La concentración inhibitoria media de los extractos con este método se corresponde con los valores obtenidos en el método de DPPH, siendo también los extractos etanólicos de hoja, corteza, cáscara y semillas los que presentaron mejor actividad antioxidante, destacando los extractos de hoja y corteza que superaron a la Rutina (0.48 mg/ml versus 0.85 mg/ml). Con las fracciones de diclorometano de hojas y acetato de etilo en corteza los valores de  $CI_{50}$  obtenidos fueron de 7.31 y 4.85 mg/ml, valores mayores a los obtenidos en el método de DPPH, probablemente debido a que el método de ABTS posee mayor sensibilidad hacia compuestos apolares, contrario al DPPH, cuya sensibilidad es mayor hacia compuestos polares. Los estándares con los que se realizó la comparación de la actividad antioxidante fueron Vitamina C, Trolox, TBHQ, Rutina y Quercetina, con valores desde 0.10 a 0.85 mg/ml, ver Tabla 10 y Anexo 11 (Morales, Sanabria y Vásquez, 2013).

La actividad antioxidante también fue evaluada con el método de FRAP, en este se midió la capacidad de reducción de los extractos que presentaron actividad positiva en los métodos anteriores. En este método se cuantifica la reducción que sufre el ion férrico ( $Fe^{+3}$ ) hacia ion ferroso ( $Fe^{+2}$ ) en presencia de compuestos antioxidantes, se pudo observar esta reacción en el cambio de color de amarillo a azul, por la formación del complejo formado con el ion ferroso con las diluciones de los extractos (Biglari, AlKarkhi y Easa, 2008; Carocho y Ferreira, 2013) Los resultados obtenidos se expresan como moles de quercetina, rutina, sulfato ferroso, trolox y vitamina C, que indican un potencial antioxidante similar del estándar con actividad reductora que posee un gramo de extracto, siendo valores altos los deseables en esta prueba, así los extractos con mayor poder reductor fueron los etanólicos de hoja, corteza, semilla y cáscara, ver tabla 11. Los extractos con menor actividad fueron el etanólico de pulpa, diclorometánico y hexánico en hojas. En relación al fruto, al comparar estos resultados con los obtenidos en el método del DPPH y ABTS se observa una disminución del poder antioxidante en cáscara. Debido a que el método de FRAP permite detectar solo compuestos que actúan por transferencia electrónica se puede subestimar el potencial de compuestos que actúen por mecanismos combinados (transferencia electrónica combinado con transferencia de átomos de Hidrógeno, siendo ABTS y DPPH métodos que detectan ambos tipos de compuestos) (Londoño, 2012)

En Brasil el extracto etanólico de semillas de *Theobroma bicolor* mostró mayor actividad antioxidante que el estándar BHT (hidroxibutiltolueno) en el método B-caroteno/ácido linoleico, que mide la capacidad antioxidante lipofílica, mientras que los utilizados en esta investigación son mayoritariamente hidrofílicos, sería de utilidad evaluar el comportamiento de los extractos de semillas en este sistema, tomando en cuenta que ningún extracto logró mostrar mayor actividad que los estándares en el método del DPPH (García et al., 2002; Huang, Ou y Prior, 2005; Sotero et al., 2011).

En la última prueba espectrofotométrica, se realizó la cuantificación de fenoles totales por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu en los extractos con actividad antioxidante. En el método se midió la capacidad reductora de la muestra expresada como mg de ácido gálico por gramo de extracto, y se realizó junto con las otras pruebas de capacidad antioxidante para encontrar correlación entre los fenoles totales presentes en las muestras y la capacidad antioxidante que presentaron. En la tabla 12 y Anexo 13, se puede observar que las muestras con mayor contenido de fenoles fueron los extractos etanólicos de hoja, corteza y semillas obteniendo valores de 0.14, 0.16 y 0.10 mg/g de extracto. Por lo anterior se puede deducir que existe correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de compuestos fenólicos en los extractos, ya que las fracciones con mayor actividad antioxidante fueron las etanólicas y también las que presentaron mayor cantidad de fenoles totales. Los compuestos fenólicos, al ser compuestos polares, son afines a solventes polares, probablemente debido a esto en los extractos etanólicos se presentó mayor capacidad antioxidante y mayor concentración de fenoles. En otras investigaciones, se han concluido que la actividad antioxidante tiene relación con los ácidos fenólicos presentes, comprobando lo antes mencionado. Esta correlación se puede evidenciar en el extracto etanólico de hojas, que posee 0.14 mg de ácido gálico/g de extracto, una de las mayores concentraciones de fenoles observadas en todos los extractos analizados y a su vez tiene alta capacidad antioxidante ( $CI_{50} = 0.41$ ). Los ácidos fenólicos que podrían encontrarse en pulpa y semilla son: ácido salicílico, trans-cinámico, p-hidroxibenzoico, protocatequina, gálico, sináptico, catequina y clorogénico, ya que Sotero y García lograron su identificación en frutos procedentes de Colombia y Brasil. (García et al., 2002; Sotero et al., 2011).

También se realizó la evaluación presuntiva de ácidos grasos por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas, ya que al someter las semillas a extracción con solventes apolares y medianamente polares (hexano, diclorometano y acetato de etilo) se obtuvieron extractos con apariencia de aceitosa, sólidos y amarillos. Debido al estado sólido de los extractos se hizo necesario su conversión a esteres metílicos y la identificación se llevó a cabo por comparación (coincidencia mayor al 90%) de los espectros obtenidos con librerías comerciales (Nist, Mainlib, Replib). En la tabla 13 se observa que en las tres fracciones se evidenció la presencia de esteres metílicos de ácidos grasos en su mayoría saturados: mirístico, palmítico, margárico, caproico, araquídico, behénico y melísico y dos insaturados. Estos ácidos grasos brindan un aporte energético, forman parte de procesos de síntesis en el cuerpo y también pueden presentar capacidad antioxidante. En otras investigaciones (Guatemala y Brasil) se han encontrado ácidos grasos que no se identificaron en este estudio: ácido esteárico, linoleico, oleico, linolénico, y heptadecenoico (los dos últimos encontrados solo en Brasil); además del palmítico, araquídico y behénico (el último solo en Guatemala), que si se identificaron. El ácido araquídico se presentó en mayor proporción (Ver porcentaje de área, tabla 13 y Anexo 14) en los tres extractos, sin embargo

el ácido esteárico fue mayoritario en las semillas procedentes de Brasil y el oleico en otra investigación de Guatemala; hay que tomar en cuenta que debido a su origen vegetal, pueden producirse variaciones de la composición de las grasas por factores geográficos, como por ejemplo el suelo y el clima. (García et al., 2002; Santizo 2013).

En la evaluación de la actividad citotóxica contra *Artemia salina*, los extractos que presentan toxicidad menor a 1000 ppm se consideran activos y con potencial para ser investigados como agentes anticancerígenos o insecticidas (Tení, 2008). En la presente investigación se realizó la prueba con todos los extractos obtenidos los cuales no mostraron toxicidad. Ver Tabla 14 y Anexo 15 (Tení, 2008). Sin embargo, otros estudios revelaron que la corteza posee una  $DL_{50}$  de 33.29 ppm, evaluada contra *Artemia salina* y actividad piscicida a una dosis de 5g/kg con un tiempo letal de una hora. (Santizo, 2013). Esta diferencia se puede deber a que en esta investigación se emplearon extractos fraccionados, que al permitir un aislamiento selectivo de metabolitos la actividad citotóxica se pudo atenuar, a la vez que se deben tomar en cuenta las distintas concentraciones de metabolitos en la planta influenciadas por el área de cultivo, época de colecta, etc.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 Se comprobó la actividad antioxidante en extractos de *Theobroma bicolor* y los que presentaron mejor actividad fueron los extractos etanólicos de hojas, corteza, cáscara y semillas con los Métodos de DPPH, ABTS, FRAP y Fenoles Totales.
- 10.2 Los extractos con mayor capacidad antioxidante presentaron el mayor contenido de fenoles totales, determinándose relación entre la concentración de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante que presentan.
- 10.3 Por medio de pruebas en tubos y de cromatografía en capa fina se evidenció la presencia de flavonoides en extractos etanólicos del fruto, en todos los extractos de hoja y en extractos medianamente polares y polares de corteza.
- 10.4 Se evidenció la presencia de alcaloides y aceites esenciales en extractos apolares y medianamente polares de hojas, corteza y semillas, también en extractos polares de semillas y cáscara de *Theobroma bicolor*.
- 10.5 Los extractos de hoja, corteza, semillas y fruto de *Theobroma bicolor* no presentaron toxicidad, debido a que no presentaron citotoxicidad menor a 1000 ppm, además debido a su contenido de grasas (17.15%), proteínas (19.50%) y carbohidratos (47.35%) tiene un alto potencial nutricional.
- 10.6 En los extractos hexánicos, diclorometánicos y de acetato de etilo se evidenció la presencia de ácidos grasos saturados; mirístico, palmítico, margárico, caproico, araquídico, behénico y melísico y dos insaturados.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Evaluar el potencial antioxidante de los extractos de semillas de *Theobroma bicolor* con el método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico y el uso de los extractos etanólicos como antioxidantes alimenticios y preservantes en formulaciones cosméticas.
- 11.2 Cuantificar e identificar el contenido de flavonoides y ácidos grasos presentes en los extractos de hoja, corteza y fruto de *Theobroma bicolor*, para determinar que compuestos están presentes en los extractos.
- 11.3 Comprobar la actividad antibacteriana de los extractos fraccionados obtenidos de hojas, corteza y fruto de *Theobroma bicolor*, ya que en otra investigación la corteza mostró actividad contra *Staphylococcus aureus*, y así identificar la fracción responsable de la dicha actividad.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam N., Bristi N.J., Rafiquzzaman Md. (2012). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21, 143-152.
- Ávalos, A., Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3), 119-145.
- Bahr, P., Basulto, Y. (2004). El Potencial Reductor Férrico (FRP). Un ensayo para evaluar la capacidad antioxidante en suero. *Correo Científico Médico de Holguín*, 8(4).
- Barrón, R., García, M., Soto, M., Colinas, T., Kite, G. (2011). Flavonoides y Actividad Antioxidante de *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Fitotecnia Mexicana*, 34(3), 151 – 157.
- Benzie, I., Strain, J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Biglari, F., AlKarkhi, A., Easa, A. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107, 1636–1641.
- Cáceres, A., Martínez, V., Cobar, O., Paz, A., Véliz, M., Saravia, A.,...Cruz, S. (2006). *Determinación Fitoquímica y de Actividad Antifúngica de Cultivares de Solanum americanum Miller y Caracterización de Preparaciones para la Industria Fitofarmacéutica* (Informe final Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas, IIQB). Guatemala: Dirección General de Investigación.
- Carpenter, D., Hammerstone, J., Romanczyk, L., Martin, W. (1994). Lipid Composition of *Herrania* and *Theobroma* Seeds. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(8), 845-851.
- Craft, B., Kerrihard, A., Amarowicz, R. y Pegg, R. (2012). Phenol-Based Antioxidants and the *In Vitro* Methods Used for Their Assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 148–173.
- Cruz, S. (2001). Fraccionamiento Bioguiado y Tamizaje Fitoquímico del Extracto Etanólico con actividad antiartemia de *Ocimum micranthum* Willd (Albahaca de Monte). (Tesis Química Farmacéutica). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Deng J., Cheng W., Yang G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125, 1430–1435.
- Díaz, A., Rodríguez, H., Scull, R. (2010). Citotoxicidad de extractos de plantas medicinales sobre la línea celular de carcinoma de pulmón humano A549. *Revista Cubana de Farmacia*. 45(1), 101-108.

- FAO Forestry Department. (1986). Food and fruit bearing forest species, 3: Examples from Latin America. Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fernández, A. (2014). *Módulo Ecotoxicología: Cálculo de las Concentraciones Letales 50 (Cl50) a 96 Horas para la Toxicidad del Nitrito en dos Especies de Invertebrados de Agua Dulce (Eulimnogammarus toletanus y Polycelis felina)*. España: Universidad de Alcalá
- Flores, P. (1997). Cultivo de Frutales Nativos Amazónicos. Lima: Tratado de Cooperación Amazónica.
- Fuentes, A. (2012). Tamizaje químico, actividad citotóxica, antioxidante y biocida de *Ecteinascidia turbinata* (Asciacea) de la costa Caribe de Guatemala. (Tesis Biólogo). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Gaitán, I. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante de cinco especies vegetales utilizadas popularmente para el tratamiento de afecciones de la memoria y los nervios. (Tesis Maestría en Producción y Uso de Plantas Medicinales MUPLAM). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Gálvez, L., Reyes, A., Avendaño, C., Hernández, E., Mendoza, A., Díaz, V. (2016). Pataxte (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.): Especie subutilizada en México. *Agroproductividad*, 9(1), 41-47.
- García, D., Assunção, D., Mancini, P., Pavan, R., Mancini, J. (2002), Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 278–281.
- García, D., Sotero, V., Mancini, D., Pavan, R., Manzini, J. (2011). Evaluación de la Actividad Antioxidante “in vivo” de Tres Frutos de la Amazonía: *Gustavia augusta* L., *Grias neuberthii* Macbr y *Teobroma bicolor*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(1), 44-55.
- González, A., Moncada, J., Idarraga, A., Rosenberg, M., Cardona, C. (2016) Potential of the amazonian exotic fruit for biorefineries: *Theobroma bicolor* (Makambo) case. *Industrial Crops and Products*, 86, 58–67.
- González, A., Torres, G. (2010). Cultivo de Macambo *Theobroma bicolor* (Humb). & Bompl. Perú: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP).
- Gudiel, L. (2009). Evaluación Fitoquímica y actividad antioxidante de *Polypodium triseriale* SW (calahuala). (Tesis Químico Farmacéutico). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Hammerstone, J., Romanczyk, L., Martin, W. (1994). Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. *Phytochemistry*, 35(5), 1237-1240.
- Hernández, M., Casas, A., Martínez, O., Galvis, J. (1998). Caracterización fisicoquímica y fisiológica del fruto de Maraco (*Theobroma bicolor* H.B.K.) durante su desarrollo. *Agronomía Colombiana*, 15(2, 3), 172-180.

- Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Jee, MH. (1984). Composities of the Fat Extracted from the Seeds of *Theobroma bicolor*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(4), 751-753.
- Kuklinsky, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732.
- León, J. (2000). *Botánica de los Cultivos Tropicales*. (2ª edición). Costa Rica: Agromérica, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Londoño, J. (2012). *Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad*. Corporación Universitaria Lasallista. Recuperado de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/handle/10567/133>
- Marroquín, M. (2011). *Comparación de la Actividad Antioxidante, Detección y Cuantificación de Flavonoides y Compuestos fenólicos en tres especies de la familia Passifloraceae (Pasiflora edulis, Pasiflora incarnata, Pasiflora ligularis)*. (Tesis Químico Farmacéutico). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Marroquín, M. (2016). *Evaluación de la Actividad Cicatrizante de Extractos Etanólicos de Hoja y Corteza de Mangle Rojo (Rhizophora mangle L.) mediante técnicas IN VITRO, para su aprovechamiento en la industria Fitofarmacéutica*. (Tesis Maestría Multidisciplinaria en Producción y Uso de Plantas Medicinales). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Moon, J., Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1655–1666.
- Morales, J., Sanabria, G., Vásquez, A. (2013). *Determinación de la presencia de alcaloides tipo Piperina y derivados en tres especies del género Piper nativas de mesoamérica y evaluación de su actividad antioxidante, P. amalago, P. Jacquemontianum y P. retalhuleuense*. (Tesis Químico Farmacéutico). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Orantes, A. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae)*. (Tesis Química). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

- Pozo, B., Irahola, S., Gimenez T. (1997). Metodología y potencial del tamizaje de plantas medicinales utilizando la prueba de *Artemia Salina*. *Biofarbo*, 6(5), 87-94.
- Quijano, C., Pino, J. (2011). Analysis of Volatile Compounds of Cacao Maraco (*Theobroma bicolor* Humb. et Bonpl.) Fruit. *Journal of Essential Oil Research*, 21(3), 211-215.
- Re, R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Rincón, A., Pérez, M., Bou, L., Romero, A., Bucarito, L., Padilla, F. (2011). Métodos para la determinación de la actividad antioxidante de vegetales. *Revista Facultad de Farmacia* 74(1), 24-28.
- Ruíz, J. (1993). Alimentos del bosque amazónico: Una alternativa para la protección de los bosques tropicales. Montevideo: UNESCO/ORCYT.
- Santizo, A. (2013). Evaluación y caracterización de aceites fijos de nueces y semillas de ocho especies vegetales nativas para su aplicación industrial (Informe Proyecto FODECYT No. 011-2010). Guatemala: CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA, CONCYT.
- Sotelo, A., Álvarez, R. (1991). Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39 (11), 1940–1943
- Sotero, V., Maco, M., Vela, J., Merino, C., Dávila, E., García, D. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia *Sterculiaceae*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(1), 66-74.
- Tení, D. (2008). Tamizaje fitoquímico, extracción fraccionada y evaluación biocida del extracto diclorometánico y metanólico de *Brosimum alicastrum* Swartz (Ramón) Fruto, semilla y hojas. (Tesis Químico Farmacéutico). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Zuleta A., Esteve M., Frigola A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 1(114), 310-316

### 13. ANEXOS

#### Anexo 1. Muestras investigadas procedentes de Samayac, Suchitepéquez.



Hojas de *Theobroma bicolor*



Corteza de *Theobroma bicolor*



Fruto de *Theobroma bicolor*, cáscara, pulpa y semillas

Fuente: Ecoparcela "El Kakawatal", Samayac, Suchitepéquez

**Anexo 2. Ingreso de muestras al Herbario BIGU, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia**

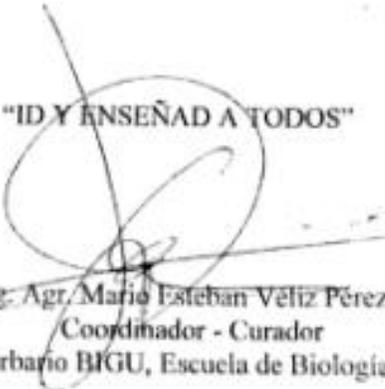
Guatemala, 02 de Mayo de 2014

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este medio se hace constar que la estudiante Libny Judith Pernillo Hidalgo con carné 200910799 de la carrera de Química Farmaceutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, ingresó al herbario BIGU el espécimen de la especie *Theobroma bicolor* Kunth., (STERCULIACEAE) la cual fue ingresada al libro de inventario y se le adjudico el número de boucher 67783; por lo que a solicitud de los interesada, se les extiende la presente en el mismo lugar y fecha arriba indicados.

Atentamente

"ID Y ENSEÑAD A TODOS"

  
Ing. Agr. Mario Esteban Veliz Pérez  
Coordinador - Curador  
Herbario BIGU, Escuela de Biología



Anexo 3. Resultado análisis químico proximal de fruto. Laboratorio de Bromatología



Solicitado por:  
 Fecha de recibida la muestra:

Elaborado por: Aura Marina de Marroquín  
 Autorizado por: Lic. Miguel Ángel Rodenas



Edificio M6, 2º Nivel, Ciudad Universitaria zona 12  
 Ciudad de Guatemala  
 Teléfax: 24188307 Teléfono 24188307 ext. 1676  
 E-mail: bromatologia@yahoo.es

**FORMULARIO BROMATO 7**  
**INFORME DE RESULTADO DE ANÁLISIS**

LIBRE PERUJILLO, CIUDAD, GUATEMALA,  
 28-03-2014, DEL 31-03 AL 03-04-2014.

Dirección:  
 Fecha de realización

Solicitado por:  
 Fecha de recibida la muestra:

Reg.	Descripción de la muestra	BASE	Agua %	M.S.T. %	E.F. %	F.C. %	PROTEINA CRUDA %	Centizas %	E.L.N. %	Calcio %	Fósforo %	F.A.D. %	F.N.D. %	Lignina %	Dig. Pepsina %	Dig. K.O.H. %	T.N.D. %	E.B. Cal/Kg	
226	PARATE	SECA	70.10	28.90	17.15	8.86	19.60	6.13	47.35										
		COMO ALIMENTO			5.13	2.95	6.83	1.83											
		SECA																	
		COMO ALIMENTO																	
		SECA																	
		COMO ALIMENTO																	
		SECA																	
		COMO ALIMENTO																	

OBSERVACIONES: Estos resultados fueron calculados en base a materia seca total y fresca. Se prohibe el producto animal a legal de este informe, para mayor información SAM contactarse al teléfono 24188307.

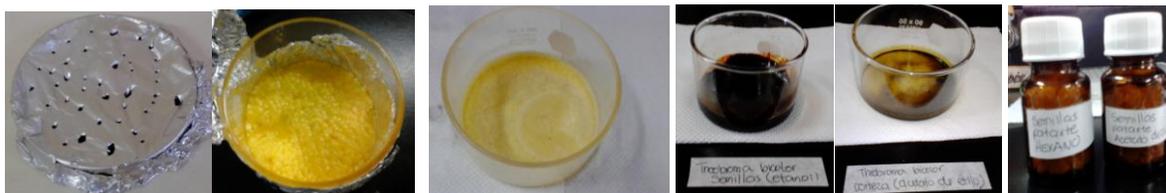
TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS EN ESTA HOJA: 3  
 Jefe Laboratorio de Bromatología

UNIVERSIDAD DE GUATEMALA  
 03/04/14  
 Resultados 2014/159

#### Anexo 4. Extracción, muestras secas y porcentajes de rendimiento.



Prueba del mejor solvente extractor para extractos etanólicos, extracción en rotavapor y disolvente recuperado de percolador

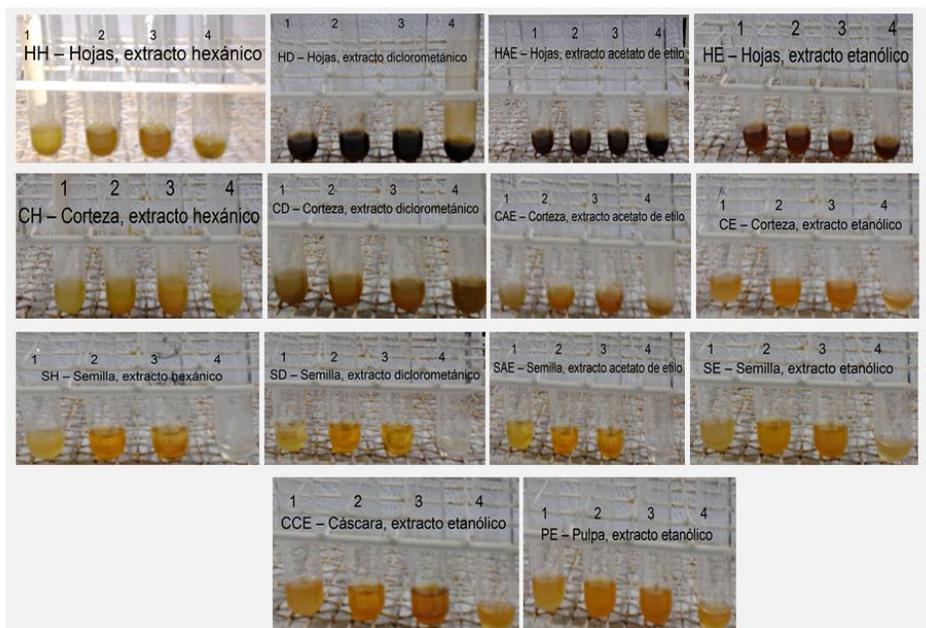


Extractos obtenidos en cristalizador y su posterior traslado a frascos

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC.

### Anexo 5. Investigación de alcaloides, ensayos en tubo y capa fina

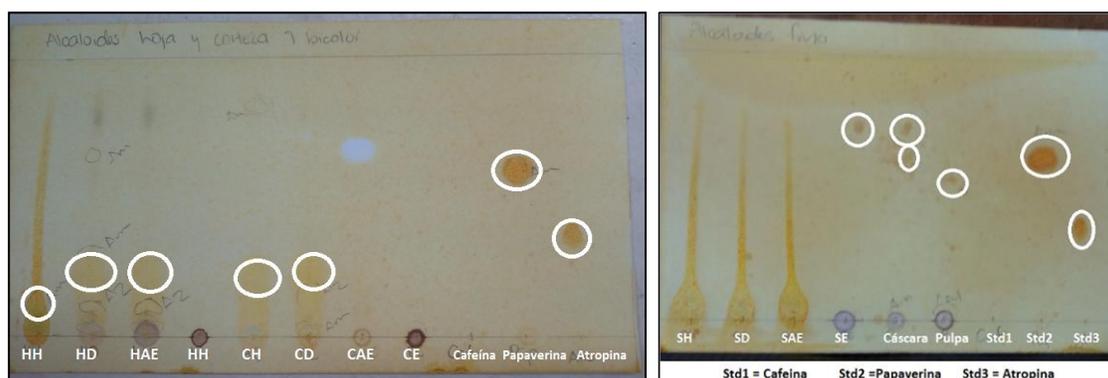
En la siguiente imagen se muestra la identificación macrométrica realizada en tubos a extractos obtenidos de hoja, corteza, semilla, cáscara y pulpa de *Theobroma bicolor*, evaluados con Reactivo de Mayer's (Tubo No. 1), Dragendorff (Tubo No. 2) y Wagner (Tubo No. 3) siendo el tubo No.4 testigo. Se tomaron como positivo los cambios de color y turbidez.



Identificación de alcaloides por medio de cromatografía en capa fina de extractos de hoja y corteza en cromatopla No. 1 y de semillas, cáscara y pulpa en cromatopla No. 2. Fase móvil: Tolueno-Acetato de etilo-dietilamina (70:20:10). Detección con Reactivo de Dragendorff. Se observan zonas naranjas en visible. una coloración naranja demuestra la actividad de los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo de ambos órganos, siendo observado en visible. Estándares: Papaverina y atropina.

Cromatopla No.1

Cromatopla No.2

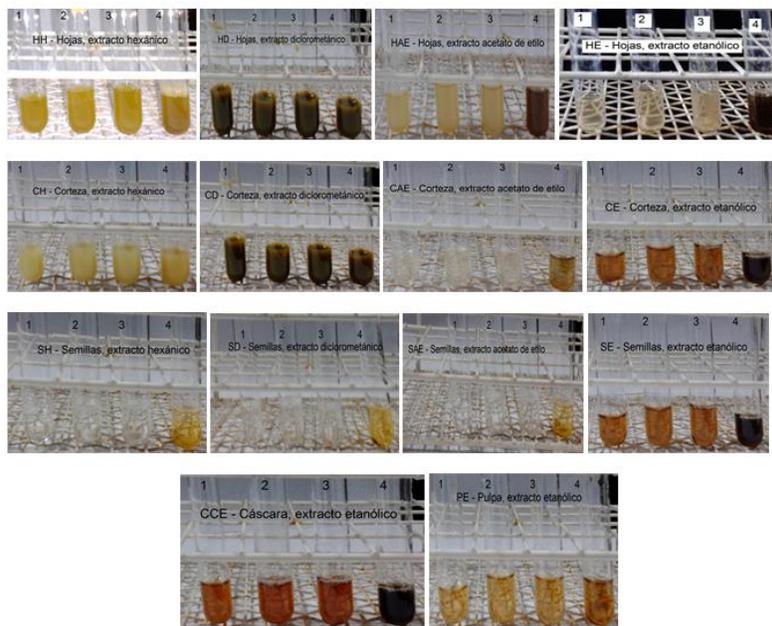


H: Hoja, C: Corteza, S: Semilla, H: hexano, D: Hojas Diclorometano, AE: Acetato de etilo, E: Etanol

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC.

### Anexo 6. Investigación de taninos, ensayos en tubo

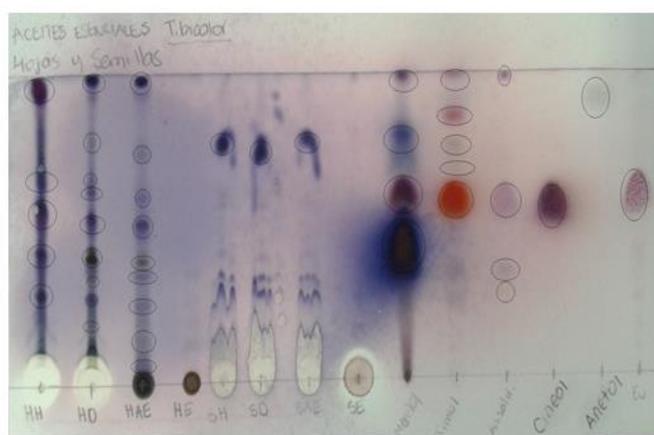
Identificación macrométrica de taninos en extractos de hoja, corteza, semillas, pulpa y cáscara de *Theobroma bicolor*, evaluados con gelatina al 1% (Tubo No. 2), Gelatina-sal (Tubo No. 3) y Cloruro férrico (Tubo No. 4) siendo el tubo No.4 testigo. Precipitado con gelatina, gelatina-sal y con cloruro férrico cambio de color (gris-negro, negro-azulado).



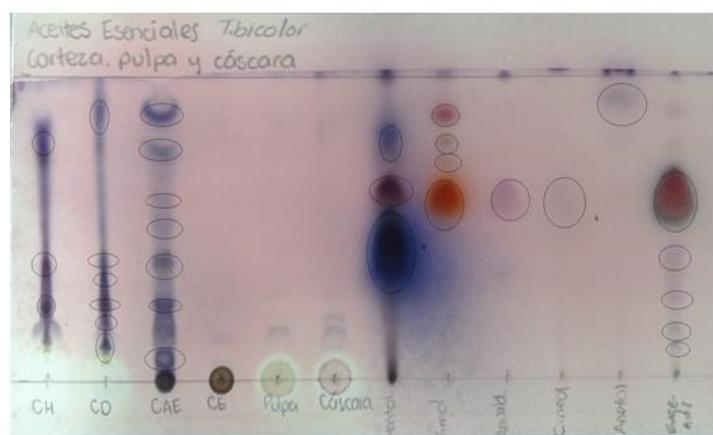
Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC.

### Anexo 7. Investigación de aceites esenciales por medio de cromatografía en capa fina

Identificación por medio de cromatografía en capa fina de aceites esenciales presentes en extractos de hoja y semillas (Cromatopla No. 1) y extractos de corteza, pulpa y cáscara (Cromatopla No. 2) Fase móvil: Tolueno-Acetato de etilo (97:3) y detección con vainillina, ácido sulfúrico y calentamiento. Presencia de zonas rojas, azules, verdes y cafés. Estándares: Mentol, timol, anisaldehído, cineol, anetol, eugenol.



Cromatopla No. 1



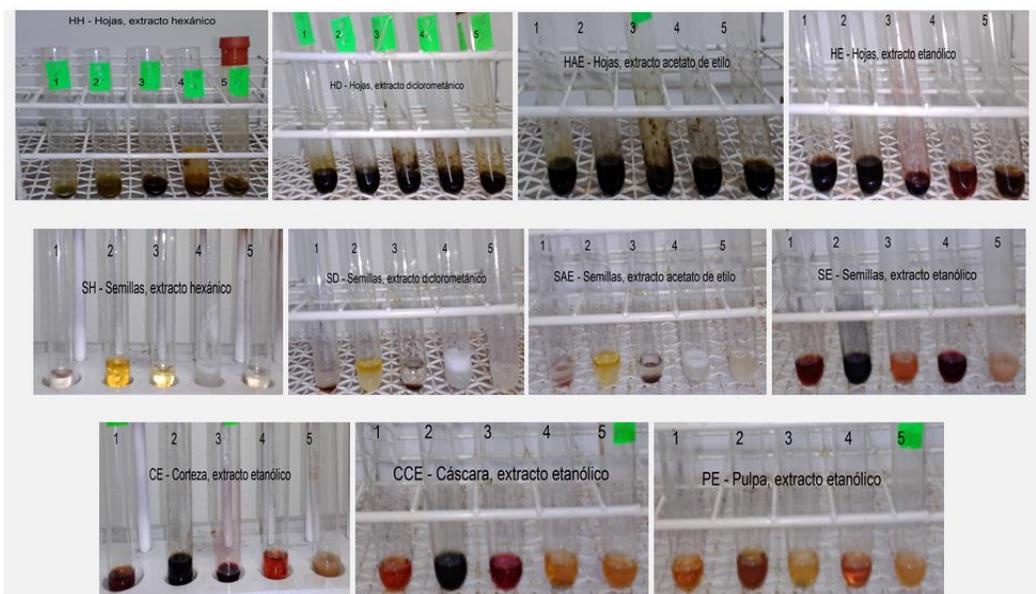
Cromatopla No. 2

H: Hoja, C: Corteza, S: Semilla, H: hexano, D: Hojas Diclorometano, AE: Acetato de etilo, E: Etanol

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC.

### Anexo 8. Investigación de flavonoides, ensayos en tubo y capa fina

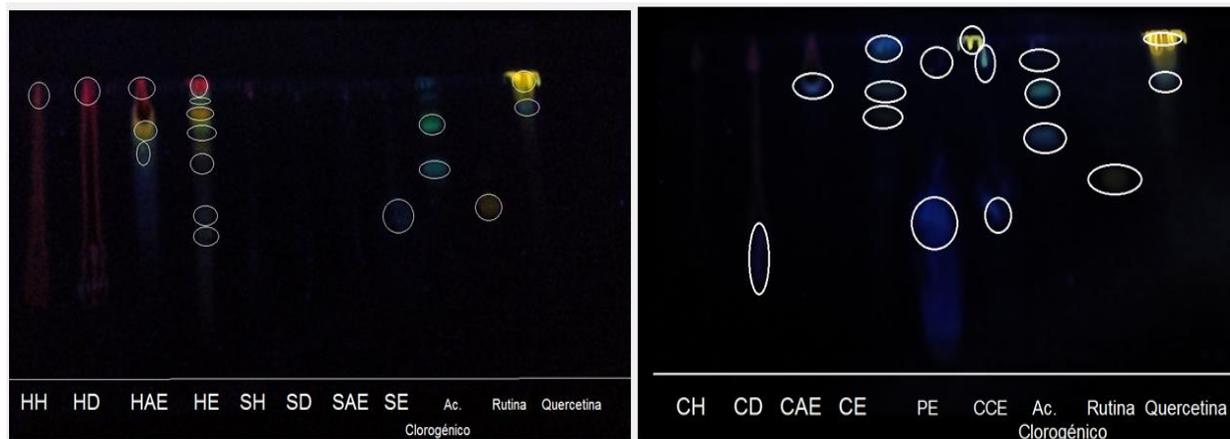
En la siguiente imagen se muestra la identificación macrométrica realizada en tubos a extractos obtenidos de hoja, semilla, corteza, cáscara y pulpa de *Theobroma bicolor*, evaluados con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (Tubo No. 1), FeCl<sub>3</sub> 10% (Tubo No. 2), HCl concentrado más calentamiento (Tubo No. 3) y magnesio metálico más HCl concentrado (Tubo No. 4), siendo el tubo No.5 testigo. Se tomaron como positivo los cambios de color y/o formación de precipitados comparados con el testigo.



Identificación por medio de cromatografía en capa fina de flavonoides presentes en extractos de hoja y semillas (Cromatoplaaca No. 1) y extractos de corteza, pulpa y cáscara (Cromatoplaaca No. 2) Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27). Estándares: Ácido Clorogénico, rutina y quercetina. Detección con reactivo de productos naturales, presencia de fluorescencia azul, amarillo y verde.

Cromatoplaaca No.1

Cromatoplaaca No.2

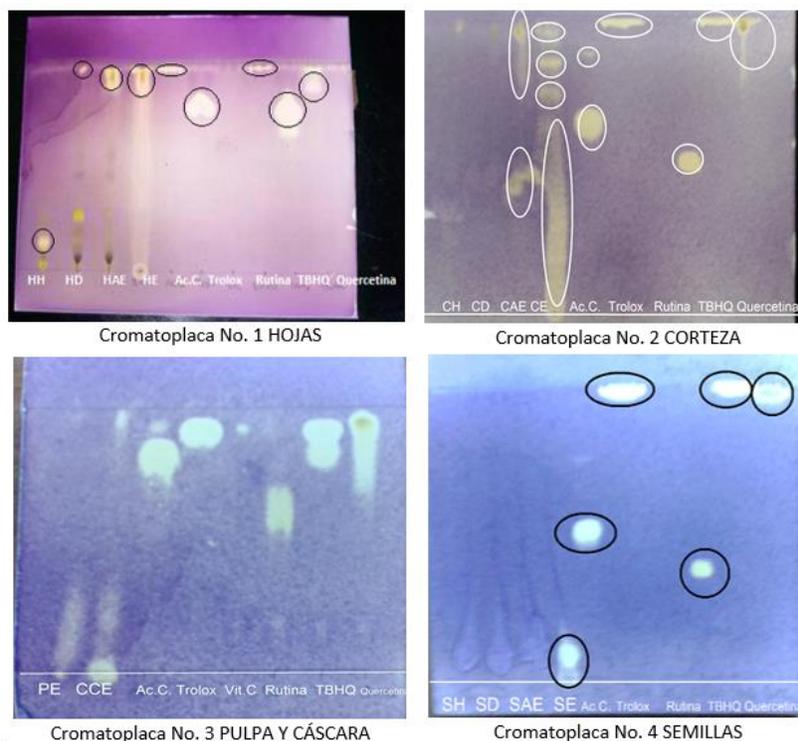


H: Hoja, C: Corteza, S: Semilla, H: hexano, D: Hojas Diclorometano, AE: Acetato de etilo, E: Etanol

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC.

### Anexo 9. Actividad antioxidante cualitativa por cromatografía en capa fina

Determinación de la actividad antioxidante cualitativa por medio de cromatografía en capa fina, en donde se observa la decoloración del radical DPPH por los extractos de hojas, corteza, semillas, pulpa y cáscara de *Theobroma bicolor* que presenta actividad positiva. Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glacial-agua (100:11:11:27). Revelador: Solución de DPPH.

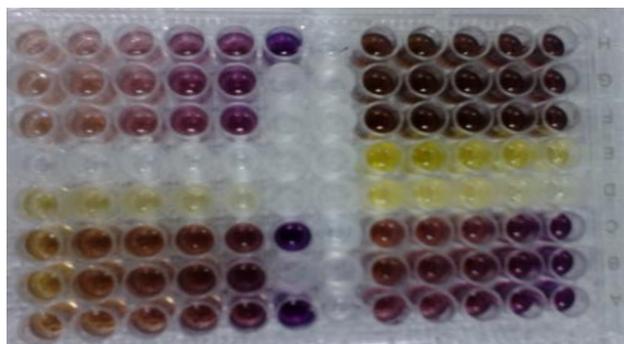


H: Hoja, C: Corteza, S: Semilla, H: hexano, D: Hojas Diclorometano, AE: Acetato de etilo, E: Etanol

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC.

### Anexo 10. Actividad antioxidante cuantitativa por el método micrométrico del DPPH

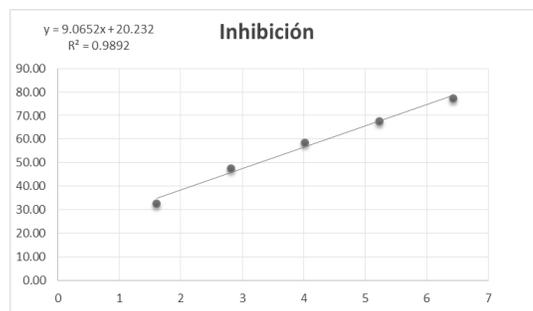
**Anexo 10.1** Microplaca con 96 pozos de reacción para la determinación cuantitativa de actividad antioxidante por medio del radical DPPH, pozos conteniendo diluciones de los extractos que presentaron actividad antioxidante cualitativa, repeticiones y blancos.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC.

**Anexo 10.2 Resultados de la actividad antioxidante por el método del DPPH micrométrico en hojas, corteza y fruto de *Theobroma bicolor*.** En la siguiente gráfica se muestran los resultados obtenidos de las curvas de calibración realizadas de los extractos que mostraron actividad antioxidante por medio de cromatografía en capa fina. Se observan las concentraciones utilizadas, absorbancias obtenidas, los porcentajes de inhibición del DPPH (entre 60% - 70%) y la concentración inhibitoria media obtenida de las tres repeticiones realizadas, con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) entre 0.97 y 0.99.

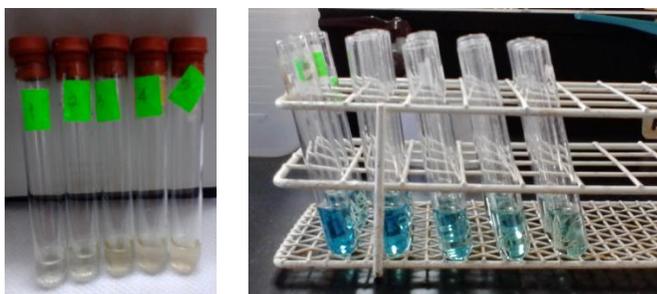
Abs. Blanco	Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	IC50	Promedio	Desviación E.	Conc (mg/ml)
0.038	0.928	0.89					
0.112	0.712	0.6	32.58				1
	0.683	0.571	35.84				(40 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
	0.701	0.589	33.82				1.608
0.155	0.622	0.467	47.53				2
	0.604	0.449	49.55				(70 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
	0.597	0.442	50.34				2.814
0.192	0.562	0.37	58.43				3
	0.499	0.307	65.51				(100 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
	0.498	0.306	65.62				4.02
0.22	0.508	0.288	67.64				4
	0.427	0.207	76.74				(130 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
	0.46	0.24	73.03				5.226
0.256	0.459	0.203	77.19	3.2838			5
	0.395	0.139	84.38	2.8163	3.0016	0.25	(160 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
	0.388	0.132	85.17	2.9049			6.432



Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

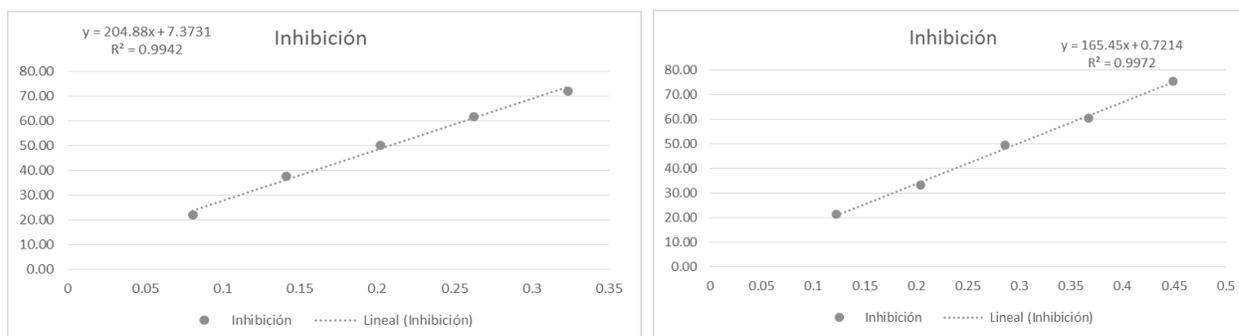
### Anexo 11. Actividad antioxidante cuantitativa por el método macrométrico de ABTS

**Anexo 11.1** Tubos de reacción conteniendo la solución de ABTS y la dilución de la muestra. Las lecturas se realizaron en espectrofotómetro UV-visible, a una longitud de onda de 734 nm.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

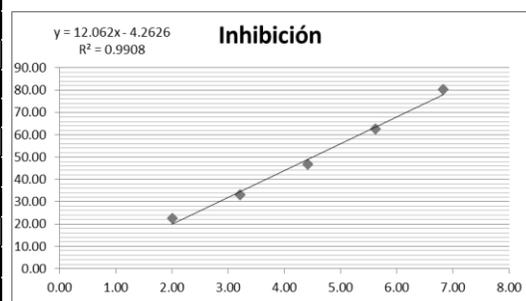
**Anexo 11.2 Resultados de la actividad antioxidante por el método de ABTS macrométrico de los estándares Vitamina C, Trolox, TBHQ, Rutina y Quercetina.** En la siguiente gráfica se muestran los resultados obtenidos de las curvas de calibración realizadas para cada dilución de los estándares frente al radical ABTS.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

**Anexo 11.3 Resultados de la actividad antioxidante por el método de ABTS macrométrico en hojas, corteza y fruto de *Theobroma bicolor*.** En la siguiente tabla y gráfica se muestran los resultados obtenidos de las curvas de calibración realizadas para las diluciones de los extractos que mostraron actividad antioxidante frente al radical DPPH. Se observan las concentraciones utilizadas, absorbancias obtenidas, los porcentajes de inhibición del ABTS (entre 60% - 70%) y la concentración inhibitoria media obtenida de las tres repeticiones realizadas, con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) entre 0.97 y 0.99.

Absorbancia	Diferencia	% Inhibición	IC50	Promedio		Conc (mg/ml)
0.70228	0.70228					
0.54429	0.54429	22.50				1
0.52157	0.52157	25.73				(50 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
0.54247	0.54247	22.76				2.01
0.47053	0.47053	33.00				2
0.45669	0.45669	34.97				(80 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
0.48716	0.48716	30.63				3.22
0.37353	0.37353	46.81				3
0.35444	0.35444	49.53				(110 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
0.39382	0.39382	43.92				4.42
2.62E-01	0.262	62.69				4
2.60E-01	0.25968	63.02				(140 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
2.24E-01	0.22385	68.13				5.63
1.38E-01	0.13774	80.39	4.49864036			5
1.11E-01	0.11061	84.25	4.29707422	<b>4.4130</b>	<b>0.1041</b>	(170 $\mu$ L/500 $\mu$ L)
1.18E-01	0.11829	83.16	4.44331099			6.83



## Anexo 12. Actividad antioxidante cuantitativa por el método micrométrico de FRAP

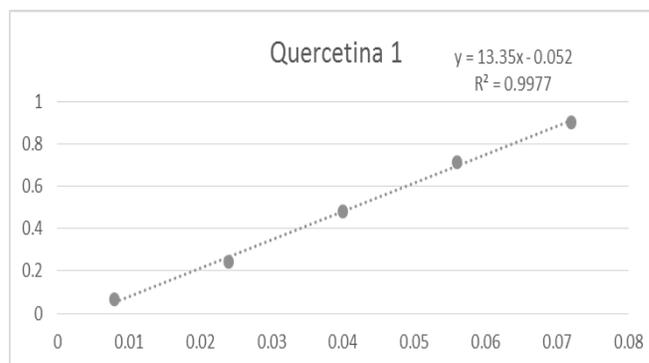
**Anexo 12.1** Microplaca con 96 pozos de reacción para la determinación cuantitativa de actividad antioxidante por medio de la prueba de reducción de hierro (FRAP), pozos conteniendo diluciones de los extractos que presentaron actividad antioxidante cualitativa, repeticiones y blancos. Las lecturas se realizaron en lector ELISA, a una longitud de onda de 630 nm.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

**Anexo 12.2 Resultados de la actividad antioxidante por el método de FRAP micrométrico de los estándares Quercetina, Rutina, Sulfato ferroso, Trolox y Vitamina C.** En la siguiente tabla y gráfica se muestran las concentraciones utilizadas y absorbancias obtenidas en las curvas de calibración realizadas para cada dilución de los estándares que reducen el ion  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Se presentan los datos obtenidos de las tres repeticiones realizadas, con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) entre 0.97 y 0.99.

Quercetina	Absorbancia	Absor. Corregida
Blanco	0.072	
1	0.138	0.066
20 $\mu$ L/5mL	0.153	0.081
	0.143	0.071
2	0.318	0.246
60 $\mu$ L/5mL	0.324	0.252
	0.318	0.246
3	0.556	0.484
100 $\mu$ L/5mL	0.573	0.501
	0.571	0.499
4	0.786	0.714
140 $\mu$ L/5mL	0.757	0.685
	0.752	0.68
5	0.972	0.9
180 $\mu$ L/5mL	0.999	0.927
	1.012	0.94



Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

**Anexo 12.3 Resultados de la actividad antioxidante por el método de FRAP micrométrico en extractos de hojas, corteza y fruto de *Theobroma bicolor*.**

En la siguiente tabla se muestran las concentraciones obtenidas a partir de las curvas de calibración de cada estándar que indican la actividad reductora que posee un gramo de extracto equivalentes a la capacidad de estándar (Quercetina, Rutina, Sulfato Ferroso, Trolox y Vitamina C). Se presentan los datos obtenidos de las tres repeticiones realizadas para cada extracto.

Absorbancia	Diferencia	Promedio	Concentración	Factor de Dilución	Peso alicuota	mM Estándar	Promedio	Desviación Estándar	M Estándar	Promedio	Desviación Estándar
<b>BLANCO</b>											
0.0690											
<b>QUERCETINA</b>											
0.295	0.226		0.0197			12.2204			0.0122		
0.248	0.179		0.0190			11.8203			0.0118		
0.295	0.226	0.2103	0.0196	12.5000	0.0201	12.1920	12.0776	0.2232	0.0122	0.0121	0.0002
<b>RUTINA</b>											
0.295	0.226		0.1142			71.0348			0.0710		
0.248	0.179		0.1076			66.9075			0.0669		
0.295	0.226	0.2103	0.1054	12.5000	0.0201	65.5452	67.8292	2.8585	0.0655	0.0678	0.0029
<b>SULFATO FERROSO</b>											
0.295	0.226		0.1604			99.7270			0.0997		
0.248	0.179		0.1557			96.8586			0.0969		
0.295	0.226	0.2103	0.1564	12.5000	0.0201	97.2910	97.9589	1.5464	0.0973	0.0980	0.0015
<b>TROLOX</b>											
0.295	0.226		0.0729			45.3363			0.0453		
0.248	0.179		0.0676			42.0476			0.0420		
0.295	0.226	0.2103	0.0693	12.5000	0.0201	43.1158	43.4999	1.6777	0.0431	0.0435	0.0017
<b>VITAMINA C</b>											
0.295	0.226		0.0679			42.2304			0.0422		
0.248	0.179		0.0645			40.1365			0.0401		
0.295	0.226	0.2103	0.0675	12.5000	0.0201	42.0081	41.4583	1.1501	0.0420	0.0415	0.0012

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

### Anexo 13. Cuantificación de compuestos fenólicos espectrofotometría UV-VIS

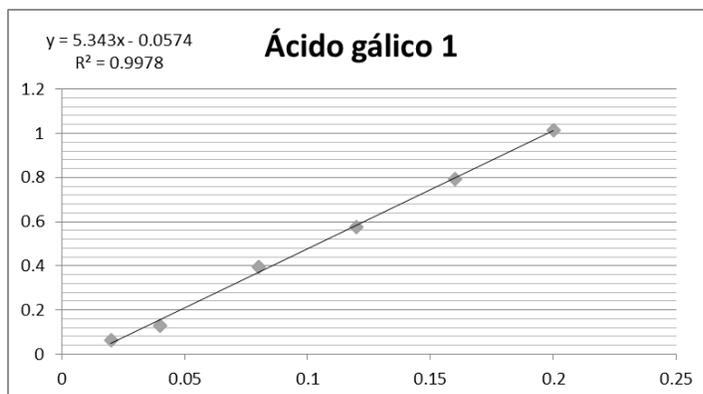
**Anexo 13.1** Microplaca con 96 pozos de reacción para la determinación cuantitativa del contenido de fenoles totales por medio del reactivo de Folin- Ciocalteu, en la imagen se observan los pozos de reacción conteniendo diluciones de los extractos que presentaron actividad antioxidante, repeticiones y blancos. Las lecturas se realizaron en lector ELISA, a una longitud de onda de 630 nm.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

**Anexo 13.2** Curva de calibración de ácido gálico para la determinación del contenido de fenoles totales en los extractos. Se presentan los datos obtenidos de las repeticiones realizadas, concentraciones utilizadas, absorbancias obtenidas y gráfica.

Ácido gálico	absorbancia	diferencia
blanco	0.0606	
0,02ug/uL	0.122	0.0614
	0.108	0.0474
	0.111	0.0504
0,04ug/uL	0.191	0.1304
	0.199	0.1384
	0.189	0.1284
0,08ug/uL	0.455	0.3944
	0.43	0.3694
	0.416	0.3554
0,12ug/uL	0.636	0.5754
	0.627	0.5664
	0.613	0.5524
0,16ug/uL	0.852	0.7914
	0.762	0.7014
	0.825	0.7644
0,2ug/uL	1.076	1.0154
	1.039	0.9784
	1	0.9394



Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

**Anexo 13.3 Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de hojas, corteza y fruto de *Theobroma bicolor*.** En la siguiente tabla se muestra el contenido de compuestos fenólicos expresados como mg de ácido gálico por g de extracto. Se presentan los datos obtenidos de las tres repeticiones realizadas para cada extracto, absorbancias, blancos, pesos de extractos y diluciones utilizadas.

Extracto	Absorbancia	Diferencia	Promedio	Concentración	Factor de Dilución	Peso alicuota g	ug ac. Galico	mg ac. Galico	Promedio	Desviación estándar
Blanco	0.059	0.084	0.05766667							
	0.059	0.08	0.08066667							
	0.055	0.078								
Hojas hexano	0.958	0.87733333		0.18411629			92.0581446	0.09205814		
	1.007	0.92633333		0.19529518			97.6475898	0.09764759	0.0957	0.0032
	1.056	0.97533333	0.92633333	0.19480305	10	0.02	97.4015243	0.09740152		
Hojas dicloro-metano	0.481	0.42333333		0.09271945			46.359723	0.04635972		
	0.496	0.43833333		0.09805249			49.0262456	0.04902625	0.0481	0.0015
	0.51	0.45233333	0.438	0.09796339	10	0.02	48.9816963	0.0489817		
Hojas acetato de etilo	0.434	0.35333333		0.07512633			37.7519264	0.03775193		
	0.429	0.34833333		0.0793341			39.8663836	0.03986638	0.0392	0.0012
	0.411	0.33033333	0.344	0.07932259	10	0.0199	39.8605955	0.0398606		
Hojas etanol	0.367	0.30933333		0.07312995			137.11866	0.13711866		
	0.391	0.33333333		0.07721003			144.768808	0.14476881	0.1422	0.0044
	0.415	0.35733333	0.33333333	0.07720732	37.5	0.02	144.763718	0.14476372		
Corteza acetato de etilo	0.777	0.71933333		0.14262898			32.0915216	0.03209152		
	0.74	0.68233333		0.1511543			34.0097176	0.03400972	0.0333	0.0011
	0.77	0.71233333	0.70466667	0.15084512	4.5	0.02	33.9401511	0.03394015		
Corteza etanol	0.419	0.36133333		0.0809907			151.857571	0.15185757		
	0.449	0.39133333		0.08557357			160.450436	0.16045044	0.1576	0.0049
	0.431	0.37333333	0.37533333	0.08553619	37.5	0.02	160.380352	0.16038035		
Semillas etanol	0.344	0.26333333		0.06034063			100.557664	0.10055766		
	0.351	0.27033333		0.06360269			105.993887	0.10599389	0.1042	0.0032
	0.342	0.26133333	0.265	0.06365637	33.33	0.02	106.083348	0.10608335		
Pulpa etanol	0.629	0.57133333		0.12303949			7.68996818	0.00768997		
	0.679	0.62133333		0.13031184			8.14449002	0.00814449	0.0080	0.0003
	0.665	0.60733333	0.6	0.13008904	1.25	0.02	8.13056498	0.00813056		
Cáscara etanol	0.309	0.25133333		0.05821948			48.6132635	0.04861326		
	0.309	0.25133333		0.06134587			51.2237976	0.0512238	0.0504	0.0015
	0.316	0.25833333	0.25366667	0.0614089	16.7	0.02	51.2764326	0.05127643		

Fuente: Datos experimentales obtenidos en Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, LIPRONAT-USAC

## Anexo 14. Identificación de ácidos grasos en extractos hexánico, diclorometánico y acetato de etilo de semillas por medio de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Identificación de compuestos obtenidos a partir de extracto de semillas en base a comparación de los espectros obtenidos con librerías comerciales (Nist, Mainlib, Replib) y cromatograma obtenido.

### Library Search Report

File: C:\TURBOMASS\SEMIVOCS.PRO\Data\10770816Theobromabicolorheptano1.raw  
 Acquired: 19-Aug-16 10:46:19 AM Printed: 22-Aug-16 09:42 AM  
 Description: 1077.08.16TheobromabicolorHexano-Pataxte 1  
 GC/MS Method: GC: Aceite esencia120214ma2.mth MS: Aceite esencia120214 Page 1 of 10  
 Sample ID: 1077.08.16TheobromabicolorHexano-Pataxte 1 Vial Number: 2

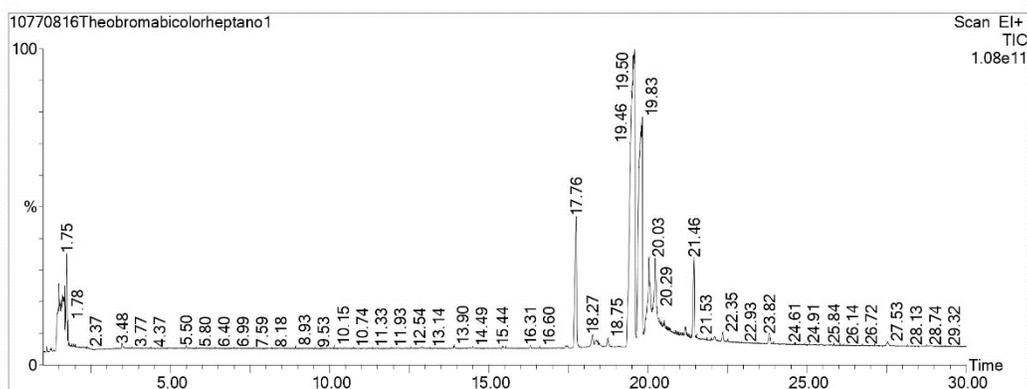
Pk #	RT	Hit	Compound Name	Match	R.Match	Prob.	CAS	Library
1	1.123	1	Ile-Met	43	942	0.0		nist_msms
		2	Pro-Phe	43	928	0.0		nist_msms
		3	Primidone	254	860	0.0	125-33-7	nist_msms
2	1.243	1	Methane, isocyanato-	857	951	0.0	624-83-9	replib
		2	Methane, isocyanato-	853	945	0.0	624-83-9	mainlib
		3	Pentane, 3-methyl-	861	942	0.0	96-14-0	mainlib
3	1.268	1	Ile-Ser	732	979	0.0		nist_msms
		2	2-Diethylamino-N-p-tolyl-acetamide	191	970	0.0		mainlib
		3	Tolycaine	187	963	0.0	3686-58-6	mainlib
4	1.509	1	Hexane, 3-methyl-	832	903	0.0	589-34-4	replib
		2	Heptane	744	883	0.0	142-82-5	replib
		3	Ethanoic acid, S-(2-methylbutyl) ester	454	877	0.0	69078-80-4	mainlib
5	1.689	1	Butane, 1,1'-oxybis[3-methyl-	311	734	0.0	544-01-4	replib
		2	1,3-Butanediamine	365	726	0.0	590-88-5	mainlib
		3	Perfluoro(1-oxaspiro[4.5]decane)	224	724	0.0	87744-16-9	mainlib
6	1.754	1	PyroGlu-Arg-Lys	297	755	0.0		nist_msms
		2	Lys-Pro-Lys	278	744	0.0		nist_msms
		3	Cyclopentanol, 2-(aminomethyl)-, trans-	644	728	0.0	40482-02-8	mainlib
7	1.784	1	1-Octen-3-ol	387	923	0.0	3391-86-4	nist_msms
		2	2-Ethylcyclohexanol	406	920	0.0	3760-20-1	nist_msms
		3	Butane, 2-cyclopropyl-	770	919	0.0	5750-02-7	mainlib
8	1.839	1	Isosorbide	772	800	0.0	652-67-5	nist_msms
		2	Ala-Gly	8	769	0.0	687-69-4	nist_msms
		3	Butane, 1,1,1,2,3,3,4,4,4-nonafluoro-2-(trifluoromethyl)-	721	747	0.0	594-91-2	mainlib
9	1.919	1	Isophthalic acid, 4-isopropylphenyl pentyl ester	20	725	0.0		mainlib
		2	Phosphine, tris(trifluoromethyl)-	715	718	0.0	432-04-2	mainlib
		3	Isophthalic acid, 3-chlorophenyl pentyl ester	20	717	0.0		mainlib
10	1.969	1	Bicyclo[3.2.0]hepta-2,6-diene	184	953	0.0	2422-86-8	mainlib
		2	Cyclobutene, 2-propenylidene-	193	944	0.0	52097-85-5	mainlib
		3	Toluene	201	942	0.0	108-88-3	mainlib

#### Inst() ACQUISITION PARAMETERS

Oven: Initial temp 60°C for 2 min, ramp 10°C/min to 220°C, hold 0 min, ramp 15°C/min to 250°C, hold 10 min, InjAauto=250°C, Volume=0 µL, Split=10:1, Carrier Gas=He, Solvent Delay=1.00 min, Transfer Temp=230°C, Source Temp=230°C, Scan: 35 to 450Da, Column 30.0m x 320µm

## Qualitative Report

File: C:\TURBOMASS\SEMIVOCS.PRO\Data\10770816Theobromabicolorheptano1.raw  
 Acquired: 19-Aug-16 10:46:19 AM Printed: 22-Aug-16 09:46 AM  
 Description: 1077.08.16TheobromabicolorHexano-Pataxte 1  
 GC/MS Method: GC: Aceite esencia120214ma2.mth MS: Aceite esencial120214 Page 1 of 4  
 Sample ID: 1077.08.16TheobromabicolorHexano-Pataxte 1 Vial Number: 2



#	RT	Scan	Height	Area	Area %	Norm %
1	1.123	25	1,970,521,472	33,807,864.0	0.071	0.22
2	1.243	49	979,376,128	17,138,610.0	0.036	0.11
3	1.268	54	1,180,519,680	29,534,318.0	0.062	0.19
4	1.509	102	22,572,883,968	1,728,975,872.0	3.621	11.20
5	1.689	138	21,798,481,920	2,451,408,128.0	5.134	15.88
6	1.754	151	32,725,528,576	1,158,119,296.0	2.425	7.50
7	1.784	157	9,783,271,424	200,719,712.0	0.420	1.30
8	1.839	168	2,279,213,056	82,747,552.0	0.173	0.54
9	1.919	184	2,029,529,472	93,334,344.0	0.195	0.60
10	1.969	194	2,020,770,560	83,532,472.0	0.175	0.54
11	2.024	205	1,911,908,992	33,394,972.0	0.070	0.22
12	2.054	211	1,154,504,192	114,862,640.0	0.241	0.74
13	2.184	237	983,581,184	46,672,388.0	0.098	0.30
14	2.284	257	916,611,712	117,494,304.0	0.246	0.76
15	2.374	275	757,538,944	81,540,672.0	0.171	0.53
16	2.914	383	308,107,840	13,679,929.0	0.029	0.09
17	3.224	445	354,834,720	14,612,979.0	0.031	0.09
18	3.314	463	439,521,088	20,030,560.0	0.042	0.13
19	3.349	470	404,589,888	18,690,536.0	0.039	0.12
20	3.484	497	2,075,546,752	129,289,008.0	0.271	0.84

### Inst() ACQUISITION PARAMETERS

Oven: Initial temp 60°C for 2 min, ramp 10°C/min to 220°C, hold 0 min, ramp 15°C/min to 250°C, hold 10 min, InjAauto=250°C,  
 Volume=0 µL, Split=10:1, Carrier Gas=He, Solvent Delay=1.00 min, Transfer Temp=230°C, Source Temp=230°C, Scan: 35 to  
 450Da, Column 30.0m x 320µm

Fuente: Datos Experimentales obtenidos en laboratorio de análisis toxicológico, USAC.

### Anexo 15. Evaluación de la actividad citotóxica contra *Artemia salina*



Incubación microplaca con pozos de reacción conteniendo *Artemia salina* y diluciones de extractos de *Theobroma bicolor*

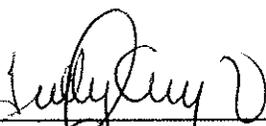
	<b>Extracto</b>	<b>Concentración</b>	<b>% de nauplios muertos</b>	<b>Citotoxicidad</b>
<b>Hojas</b>	Hexano	1.1 mg/mL	20%	> a 1 mg/ml
	Diclorometano	1.3 mg/mL	10%	> a 1 mg/ml
	Acetato de Etilo	1.1 mg/mL	13%	> a 1 mg/ml
	Etanol 70%	1.0 mg/mL	10%	> a 1 mg/ml
<b>Corteza</b>	Hexano	1.0 mg/mL	43%	> a 1 mg/ml
	Diclorometano	1.0 mg/mL	27%	> a 1 mg/ml
	Acetato de Etilo	1.1 mg/mL	17%	> a 1 mg/ml
	Etanol 50%	1.2 mg/mL	13%	> a 1 mg/ml
<b>Fruto</b>	Hexano	1.2 mg/mL	13%	> a 1 mg/ml
	Diclorometano	1.1 mg/mL	7%	> a 1 mg/ml
	Acetato de Etilo	1.1 mg/mL	23%	> a 1 mg/ml
	Semillas Etanol 50%	1.1 mg/mL	3%	> a 1 mg/ml
	Pulpa Etanol 95%	1.1 mg/mL	10%	> a 1 mg/ml
	Cáscara Etanol 50%	1.1 mg/mL	17%	> a 1 mg/ml
<b>Controles</b>	Positivo (Cloro)		100%	
	Negativo (Agua de mar)		0%	
	Negativo (Agua pura)		0%	

Cálculo del porcentaje de citotoxicidad de extractos de *Theobroma bicolor* frente a *Artemia salina*.



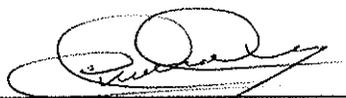
---

Libny Judith Pernillo Hidalgo  
Autora



---

Dra. Sully Margot Cruz Velásquez  
Asesora



---

Lcda. María Nereida Marroquín Tinti  
Revisora



---

Lcda. Hada Marieta Alvarado Beteta, M.A.  
Directora de Escuela



---

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda  
Decano