

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-MANAGUA
RECINTO UNIVERSITARIO RUBÉN DARÍO
FACULTAS DE CIENCIAS E INGENIERIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**TESIS DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN
QUÍMICA FARMACÉUTICA.**



**TÍTULO: PROPIEDAD ANTIOXIDANTE DEL CACAO NICARAGUENSE
PROVENIENTE DE LA RAAS, RIO SAN JUAN, GRANADA Y PRODUCTOS
ALIMENTICIOS CON CONTENIDO DE CACAO DE MANAGUA.
ENERO-SEPTIEMBRE 2010**

Autora:
Bra. Sara Negaresh

Tutor:
MSc. Iván Marín

Asesores:
MSc. María Natalia Gutiérrez

Managua, Noviembre del 2010

INDICE

Resumen	3
---------------	---

I.GENERALIDADES

1.1 Introducción	4
1.2 Antecedentes	5
1.3 Justificación	8
1.4 Planteamiento del problema.....	9
1.5 Objetivos	10

II. MARCO TEORICO

2.1 Reseña histórica del <i>Theobroma cacao L.</i>	11
2.2 Antioxidantes	14
2.3 Polifenoles del <i>Theobroma cacao L.</i>	19
2.4 Radicales Libres.....	25
2.5 Estrés Oxidativo.....	29
2.6 Aterosclerosis.....	32
2.7 Enfermedad de Parkinson.....	33
2.8 Enfermedad de Alzheimer.....	35
2.9 Cáncer.....	37

III. HIPÓTESIS.....	39
---------------------	----

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de estudio.....	40
3.2 Población y muestra.....	40
3.3 Variables de estudio.....	41
3.4 Materiales y métodos.....	42

V. RESULTADOS.....	44
--------------------	----

VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	47
---	----

CONCLUSIONES.....	50
-------------------	----

RECOMENDACIONES.....	51
----------------------	----

BIBLIOGRAFÍA.....	52
-------------------	----

ANEXOS	
--------	--

RESUMEN

Con el propósito de ofrecerle a la población información sobre un producto alimenticio que ha sido asociado a la prevención del estrés oxidativo, se desarrolló este estudio demostrando que *in vitro*, el cacao posee alta actividad antioxidante capaz de contrarrestar la nociva acción de los radicales libres.

La cuantificación de polifenoles fue determinada a través del método de Folin-Ciocalteu y para la determinación de la actividad antioxidante se empleó el método de DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), expresando los resultados en porcentaje de decoloración del radical DPPH.

Los granos de *Theobroma cacao L.* analizados en el presente trabajo mostraron una alta actividad antioxidante. Los valores más altos obtenidos fueron, 88.1 % para los polifenoles libres y solubles, y 85.12 % para los polifenoles totales. Un aspecto importante que se demostró es, la pérdida significativa del contenido de polifenoles en muestras procesadas industrialmente en relación a las muestras no procesadas.

Los polifenoles presentes en las muestras de granos de cacao y sus derivados, *in vitro*, muestran una excelente capacidad de secuestro de radicales libres, por lo que el estudio de este grano pudiera considerarse para futuras investigaciones *in vivo*.

1.1 INTRODUCCIÓN

La oxidación de las biomoléculas es un término que se refiere a la oxidación de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos entre otros componentes de la célula, que a la larga producen daños severos en el organismo. Este proceso, desde el punto de vista químico, es una reacción de transferencia de electrones. Los radicales libres son la causa principal de la oxidación de biomoléculas, por lo que el exceso de radicales libres en el organismo se ha relacionado con una mayor incidencia de diversas enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardíacas, inflamación, artritis, disfunción cerebral, aceleración del envejecimiento, etc.

El uso de antioxidantes por su alta capacidad de secuestro de radicales libre ha sido asociado con la prevención del estrés oxidativo. Estos antioxidantes actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libre, impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrógeno de forma que se neutralizan los radicales libres.

Los polifenoles son compuestos provenientes del metabolismo secundario de las plantas y se encuentran naturalmente en alimentos y bebidas de origen vegetal. Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de uno o más anillos tipo benceno. Ellos se relacionan directamente con algunas características de los alimentos como son el sabor, color y el valor nutricional. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos y flavonoides como las catequinas, epicatequinas, procianidinas, quercetina y los taninos entre otros, entre los cuales el más activo biológicamente es la epicatequina.

En esta investigación se pretende determinar la concentración y la actividad antioxidante de polifenoles presentes en los granos de cacao (*Theobroma cacao*) y productos alimenticios derivados de éste.

1.2 ANTECEDENTES

En Nicaragua, no se han realizado investigaciones relacionadas con las propiedades antioxidantes del cacao, por lo que se puede afirmar que este es el primer experimento que se desarrolló en el país. Por otra parte no se encontró información de investigaciones de esta naturaleza en Centroamérica.

En América Latina solamente se encontraron investigaciones relacionadas con el tema en la Universidad de la Habana y en la Universidad Central de Venezuela, con las investigaciones respectivas de: “Estrés oxidativo y antioxidantes: actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos” y “Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces”.

Entre otros países que se han interesado por estudiar los antioxidantes y su relación con el desarrollo del estrés oxidativo se cuentan: Malasia, Italia y España, demostrando que los polifenoles poseen una alta actividad antioxidante capaz de combatir los radicales libres causantes del estrés oxidativo.

Lima, L. (2000; 22:35-40) en su investigación “Estrés oxidativo y antioxidantes: actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos” realizada en la Universidad de la Habana, Cuba, afirma que el estrés oxidativo es responsable de las lesiones oxidativas de moléculas de gran importancia biológica como la proteínas, lípidos y ácidos nucleicos lo cual conduce a la muerte celular y desarrollo de diversas enfermedades, sobre todo de tipo crónico como la aterosclerosis, y probablemente la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, etc.

Tráncito, M. (2002; 21:108-114) establece en su investigación “Fitoterapia: Propiedades de los Flavonoides” realizada en Madrid, España que los flavonoides farmacológicamente se destacan por su baja toxicidad y elevada acción antioxidante por su capacidad de inhibir la peroxidación lipídica al reducir radicales libres y quelar metales. Además explica que los flavonoides presentan en general actividad sobre el sistema vascular con acción vitamínica P (efecto protector de la pared vascular, debido a la disminución de la permeabilidad y al aumento de la resistencia de los capilares). En fitoterapia los flavonoides se emplean principalmente en casos de fragilidad capilar como venotónicos. Aunque también se utilizan en proctología, metrorragias y retinopatías.

Martínez, S. (2002; 17:271-278) en su estudio “Los flavonoides: propiedades y acción antioxidante” desarrollado en la Universidad de León, España, afirma que el creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. Debido a este hecho se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal, e inflamaciones.

Osman, H. (2004; 86:41-46) en su estudio “Extracts of cocoa leaves and their antioxidation potencial” realizado en la Universidad de Kebangsaan, Malasia, comprobó que el cacao, tanto en hojas como en semillas, tiene mayor cantidad de polifenoles en relación con el té verde. El contenido total de polifenoles es significativamente más alto en las hojas de cacao con un porcentaje de 28,0%, las semillas presentan un contenido de 19, 0% y el té verde contiene 17.3%. Los altos contenidos de polifenoles en cacao, se pueden atribuir, según Osman, a la edad de los árboles, ya que se ha demostrado que durante la etapa de la madurez se aumenta la concentración de polifenoles en cacao.

Lecumberri, E. (2006; 21:622-628) afirma en su estudio “Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación” realizado en Barcelona, España, que el cacao está reconocido como una fuente dietética importante de antioxidantes dado su elevado contenido en compuestos fenólicos y en su investigación demostró que el contenido de polifenoles en la fibra de cacao (1,5% del peso seco) es significativamente inferior al correspondiente a las semillas de cacao (6.8% del peso seco), presumiendo así que el proceso para obtener la fibra de cacao tiene como consecuencia una severa disminución del contenido de polifenoles.

Así mismo sugiere que los polifenoles del cacao se relacionan positivamente con las enfermedades cardiovasculares al inhibir la peroxidación lipídica, la activación plaquetaria y la actividad de ciclooxigenasas y de lipooxigenasas. Además afirma que los polifenoles del cacao muestran una actividad anticancerígena en ratas al disminuir los niveles de 8-hydroxy-20-deoxyguanosine, un biomarcador del daño oxidativo producido al ADN, lo cual sugiere un rol importante de los flavonoides en la inhibición del desarrollo del cancer.

Wollgast, J. (2007; 33:423-447) en su investigación “Review on polyphenols in *Theobroma cacao* : changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification” desarrollada en el Instituto para la salud y protección al consumidor, Italia, afirma que los polifenoles del cacao se encuentran almacenados en células pigmentarias, cotiledones. En dependencia de la cantidad de antocianinas estas células pigmentarias, también llamadas células de almacenamiento de polifenoles, se tornan de colores desde blanco hasta púrpura oscuro o café. Se han identificado tres grupos de polifenoles en el cacao: catequinas con un 37%, antocianinas con un 4% y proantocianidinas con un 58%. La principal catequina encontrada es la (-)- epicatequina con un porcentaje de 35% del contenido total de polifenoles.

Halliwel, B. (2007; 73:341-347) en su estudio “Dietary polyphenols: Good, bad or indifferent for your Health?” realizado en la Universidad Nacional de Singapur, Malasia, asegura que los flavonoides y otros polifenoles tienen una potente actividad antioxidante *in vitro*, siendo capaces de captar gran cantidad de especies reactivas, incluyendo el radical hidroxilo y el radical superóxido. Además según Halliwel, los flavonoides pueden inhibir daños moleculares producidos por los peroxinitrilos (ONOO⁻).

Padilla, F. (2008; 58:303-308) en su investigación “Contenido de polifenoles y actividad antioxidante de varias semillas y nueces”, desarrollada en Caracas, Venezuela, compara el contenido de polifenoles, la actividad antioxidante, el poder reductor y la actividad antirradical de las semillas de *Theobroma cacao* (cacao), *Campsiandra comosa* Benth (chiga), *Sorghum bicolor*, L. Moench (sorgo) y *Melicoccus bijugatus* (mamón) a partir del método de Folin-Ciocalteu y el métodos del β-caroteno/linoleato respectivamente. Los resultados demostraron que las semillas de *Theobroma cacao* presentan el mas alto contenido de polifenoles (6,66 EAGg/100g) en relación con los otros productos estudiados. Asimismo, el poder reductor y la actividad antioxidante del cacao comparable a la del butil hidroxianisol (BHA), antioxidante sintético resultó ser el más alto.

1.3 JUSTIFICACIÓN

El cacao es rico en polifenoles, principalmente en catequinas, epicatequinas y sus oligómeros procianidinas. Los polifenoles, *in vitro*, han demostrado tener una gran actividad antioxidante, como captadores de radicales libres, sin embargo, Nicaragua no cuenta con estudios relacionados con la cuantificación y actividad antioxidante de cacao y/o productos alimenticios derivados de él.

Cabe destacar que Nicaragua históricamente ha sido productora de cacao, todavía se cuentan leyendas que relacionan el cacao a la poblaciones autóctonas y a los españoles.

Por otra parte la ciencia moderna ha demostrado que el cacao posee una alta actividad antioxidante capaz de inhibir la nociva acción de radicales libres, que en conjunto con una dieta balanceada y una actividad física adecuada pudiera mejorar la calidad de vida de una persona.

En base a lo anterior se considera importante, para el desarrollo científico, económico y especialmente farmacéutico, el estudio de la cuantificación y actividad antioxidante de polifenoles contenidos en el cacao y productos alimenticios derivados de éste.

1.4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La globalización del mercado a nivel internacional ha vuelto más rígidos y exhaustivos los controles de productos alimenticios. Nicaragua al igual que muchos países del tercer mundo no cuenta con la investigación necesaria de los productos que podría ofrecer a este creciente mercado global por lo que se considera de suma importancia la investigación de los contenidos nutricionales de productos que se ofrecen en el mercado.

Este tipo de investigación aplicada es de mucha importancia para el desarrollo de soluciones a problemas que aquejan a la población.

A pesar de que la población autóctona de Nicaragua ha utilizado a través de la historia el cacao, hasta nuestros días es muy poco el aporte científico de esta tradición debido a la falta de investigaciones sobre las propiedades de este fruto, del cual son muchas las bondades que pueden describirse desde antaño: la bebida de chocolate se consideraba afrodisíaco, con propiedades calmantes y estimulantes, por lo tanto llamado “Bebida de los Dioses”.

A través de investigaciones, se ha demostrado que en el cacao están presentes cantidades considerables de polifenoles con altas capacidades antioxidantes, por lo que del cacao podría obtenerse una amplia gama de productos benéficos para la salud y aplicables a los organismos desde su consumo como alimento o productos farmacéuticos como cremas para prevenir el envejecimiento, bloqueadores solares, cápsulas entre otros.

1.5 OBJETIVOS

Objetivo general

- Valorar la actividad antioxidante de los granos de *Theobroma cacao L.* proveniente de la RAAS, Río San Juan, Granada y productos alimenticios con contenido de cacao de Managua. Enero-Septiembre 2010.

Objetivos específicos

- Cuantificar la concentración de polifenoles totales y libres, en muestras de granos de cacao y sus derivados, usando el método de Folin-Ciocalteu.
- Determinar la actividad antioxidante de polifenoles totales y libres, en muestras de granos de cacao y sus derivados, usando el método DPPH.
- Comparar el contenido de polifenoles de productos alimenticios procesados industrialmente y de granos de cacao no procesados.

MARCO TEÓRICO

En los últimos años se ha despertado el interés en el estudio del *Theobroma cacao L.*, por su alto contenido de polifenoles y su posible implicación en la salud humana, en la prevención y el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer.

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio bioquímico que se produce por el exceso de radicales libres cuya acción no puede ser contrarrestada por el sistema antioxidante endógeno. Cuando la concentración de radicales libres sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce estrés oxidativo, este desbalance puede causar efectos tóxicos que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN.

Investigaciones científicas realizadas por diversos autores como *Lecumberrie, E (2006; 21:622-628).*; *Halliwell, B. (2007; 73:341-347)* y *Wollgast, J. (2000; 33:423-447)* entre otros se han enfocado a lo largo de los años a identificar los factores que inducen el desarrollo de enfermedades y las formas de contrarrestarlo.

En dichas investigaciones se ha atribuido a los antioxidantes la prevención de patologías como enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, accidentes cerebro vasculares y envejecimiento prematuro las cuales han causado un incremento en las tasas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La contaminación ambiental y los malos hábitos alimenticios han sido la principal causa del aumento de radicales libres en el organismo. Este incremento de la concentración de radicales libres requiere de uso de antioxidantes para neutralizar su acción y prevenir el estrés oxidativo que produce la muerte y el deterioro celular.

2.1 RESEÑA HISTÓRICA DEL *THEOBROMA CACAO L.*

Theobroma cacao L. es el nombre científico del árbol de cacao o cacaotero, según la clasificación de Carlos Linneo. En griego significa “ alimento de los Dioses”; pero el cacao viene del maya *Ka'kaw*, frase relacionada con el fuego (kakh) escondido en sus almendras (*Menocal, O. 2005; 1-12*).

Se cree que el árbol de cacao es originario de la Amazonía, y que más tarde se extendió a América Central y México. Las culturas nativas de esta región, por ejemplo los mayas y los aztecas, ya lo conocían y lo utilizaban. Para los mayas el cacao simbolizaba vigor físico y longevidad. Preparaban un brebaje amargo el *Chocolha* hecho de semillas de cacao que consumían exclusivamente los reyes y los nobles (*Menocal, O. 2005; 1-12*).

Tanto los mayas como los aztecas usaban el chocolate con fines terapéuticos. Los médicos mayas prescribían el consumo de cacao como estimulante y calmante. En cuanto a los aztecas, consideraban que una taza de *xocolatl* eliminaba el cansancio y estimulaba las capacidades psíquicas y mentales. Para los aztecas el chocolate era una fuente de sabiduría espiritual, energía corporal y potencia sexual. Era muy apreciado como producto afrodisíaco y era una de las bebidas favoritas en las ceremonias nupciales. Además los granos de cacao se utilizaban como moneda.

Cristóbal Colón descubrió el cacao en América, pero el cacao en grano no fue bien acogido en aquel momento en Europa. Unos 20 años más tarde, Hernán Cortés descubrió la bebida amarga consumida por los aztecas y envió los granos de cacao y la receta al Rey Carlos V. Los españoles cambiaron la receta, añadiendo azúcar y calentando los ingredientes para mejorar el sabor (*Coe, S. D. et.al. 1996; 3:54-58*).

Al ver que los granos de cacao se usaban como moneda y que los aztecas atribuían a la bebida de cacao virtudes reconstituyentes y afrodisíacas, Hernán Cortés decidió explorarlo comercialmente, le pagaba a sus soldados con granos de cacao e intercambiaba este preciado fruto por oro, metal poco apreciado por los nativos.

2.1.1 Cultivo de cacao en Nicaragua

El cultivo del cacao (*Theobroma cacao L.*) fue la base de la economía indígena en Nicaragua desde antes del siglo XVII y ya para la llegada de los Españoles, se utilizaba en la mayoría de las actividades comerciales dado que servía como alimento (chocolate sólido), bebidas (chocolate líquido) y como moneda de curso legal para el intercambio comercial. En el siglo XVIII, el cacao nicaragüense llegó a ser considerado de altísima calidad por su delicioso sabor, olor, fina calidad y por el gran tamaño de su semilla.

El cacao nicaragüense era ‘Criollo’ (autóctono de Nicaragua), lo cual lo confirma Kennedy al indicar que era catalogado como “Cacao fino”, por su almendra grande, rechoncha, blanca y púrpura pálida, con un período de fermentación corto y al tostar las almendras – su producto era de altísima calidad. Ya para el siglo XIX, el cacao nicaragüense era reconocido a nivel internacional

debido a los famosos chocolates Menier (Jean, Emilio, y Hubert-Jacques de origen Francés), quienes exportaban el cacao producido en el valle de Nandaime, Granada, a París, Francia. Sin embargo, la extrema susceptibilidad de los ‘Cacaos Criollos’ a las enfermedades y condiciones adversas del medio ambiente, determinó que fuesen substituidos por cacaos más vigorosos y más resistentes a las enfermedades pero de menor calidad (*Menocal, O., 2005; 1-12*).

2.1.2 Morfología y Taxonomía

Familia: *Malvacea*.

Especie: *Theobroma cacao* L.

Origen: Trópicos húmedos de América, noroeste de América del Sur, zona amazónica.

Planta: Árbol de tamaño mediano (5-8 m) aunque puede alcanzar alturas de hasta 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa. Su corona es densa, redondeada y con un diámetro de 7 a 9 m. Tronco recto que se puede desarrollar en formas muy variadas, según las condiciones ambientales.

Sistema radicular: Raíz principal pivotante y tiene muchas secundarias, la mayoría de las cuales se encuentran en los primeros 30 cm de suelo.

Hojas: Simples, enteras y de color verde bastante variable (color café claro, morado o rojizo, verde pálido) y de pecíolo corto.

Flores: Son pequeñas y se producen, al igual que los frutos, en racimos pequeños sobre el tejido maduro mayor de un año del tronco y de las ramas, alrededor en los sitios donde antes hubo hojas. Las flores son pequeñas, se abren durante las tardes y pueden ser fecundadas durante todo el día siguiente. El cáliz es de color rosa con segmentos puntiagudos; la corola es de color blancuzco, amarillo o rosa. Los pétalos son largos.

Fruto: De tamaño, color y formas variables, pero generalmente tienen forma de baya, de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro, siendo lisos o acostillados, de forma elíptica y de color rojo, amarillo, morado o café. La pared del fruto es gruesa, dura o suave y de consistencia como de cuero. Los frutos se dividen interiormente en cinco celdas. La pulpa es blanca, rosada o café, de sabor ácido a dulce y aromática. El contenido de semillas por baya es de 20 a 40 y son planas o redondeadas, de color blanco, café o morado, de sabor dulce o amargo (*Peña, C. 2000; 2:252-256*).

2.2 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes son sustancias capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres, donando electrones para retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. Los radicales libres producen reacciones en cadena que causan daño a las células, los antioxidantes terminan estas reacciones quitando los intermediarios del radical libre, oxidándose ellos mismos y deslocalizando el electrón no apareado de su estructura y formando un complejo más estable (*Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. 2004; 14: 1677-9*).

Los antioxidantes se pueden clasificar según su solubilidad en agua o en lípidos. En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos. Estos compuestos se pueden sintetizar en el cuerpo u obtenerse de la dieta. Existen diversos sistemas enzimáticos y no enzimáticos que contribuyen a la inactivación de las reacciones de radicales libres (*Cotran, S., Kumar V, et al. 2000; 1-50*).

La importancia relativa y las interacciones entre estos diferentes antioxidantes constituye un área compleja, con varios metabolitos y sistemas de enzimas teniendo efectos sinérgicos e interdependientes unos de otros. La acción de un antioxidante puede depender de la función apropiada de otros miembros del sistema antioxidante. La capacidad de protección proporcionada por cualquier antioxidante depende de su concentración, de su reactividad hacia los radicales libres y del estado de los antioxidantes con los que interactúa (*Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. 2004; 14: 1677-9*).

Los antioxidantes no solo inactivan los radicales libres ya formados, sino que tienen la capacidad de bloquear el inicio de la formación de radicales libres, a través de la quelación de metales de transición, los cuales catalizan las reacciones de oxidación dentro de la célula; también tienen la capacidad de impedir la propagación de reacciones en cadena iniciados por radicales libres, como en el proceso de la peroxidación lipídica (**Figura 1, Anexo 1**).

2.2.1 Sistema antioxidante enzimático

Las células poseen su propio mecanismo de defensa ante los radicales libres controlado por sistemas enzimáticos antioxidante. El superóxido (O_2^-) liberado por la mitocondria durante la cadena de transporte de electrones, se reduce a agua debido a la acción de varias enzimas que conjuntamente inhiben la formación de esta especie reactiva de oxígeno (ERO). Esta ruta de destoxificación es el resultado de la acción de superóxido dismutasa (SOD), catalasas y varias peroxidasas. A continuación se explicará la acción de cada una de ellas en la inhibición de la formación de radicales libres (**Esquema 1, Anexo 2**).

Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa (SOD) convierte el superóxido (O_2^-) en peróxido (H_2O_2) y agua (H_2O). Constituye una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.

En el cuerpo humano existen tres formas de superóxido dismutasa: SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2 en la mitocondria y SOD3 en el líquido extracelular. La primera es un dímero (consiste en dos subunidades), mientras que las otras son tetrameros (cuatro subunidades). SOD1 y SOD3 contiene cobre y zinc, mientras que SOD2 tienen manganeso en su centro reactivo.

La SOD protege a las células de las reacciones dañinas del superóxido. La reacción de superóxido con especies no radicales no es permitida, en sistemas biológicos esto significa que sus principales reacciones suceden entre ellos mismos (dismutación) o con otro radical biológico como el óxido nítrico (NO). El anión radical superóxido (O_2^-) espontáneamente dismuta a O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de forma bastante rápida. SOD es biológicamente necesaria porque reacciona aún más rápido con algunos blancos, como el radical de NO, que forma peroxinitrito (ONOO) (*Elchuri, et al., S. 2005; 24:367-380*).

Los estudios experimentales con ratones han demostrado que la ausencia del SOD2 produce la muerte a los pocos días de nacido, debido al estrés oxidativo masivo. (Li, Y., *et al.* 1995). Los ratones con deficiencias de SOD1 desarrollan una gran variedad de patologías, incluyendo hepatocarcinomas, una acelerada pérdida de la masa muscular relacionada con la edad, una temprana incidencia de cataratas y una esperanza de vida reducida. Por su parte la falta de SOD3 en ratones, no muestra deficiencias obvias y una esperanza de vida normal (*Elchuri, et al., S. 2005; 24:367-380*).

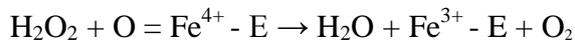
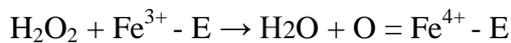
Glutación peroxidasas

La glutación peroxidasa tiene como principal función proteger al organismo del efecto degradante de los hidroperóxidos formados de forma endógena.

Catalasas

La catalasa es una enzima que se encuentra en las células de los tejidos animales y vegetales, también en microorganismos. Su función es descomponer una molécula tóxica, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) resultante del metabolismo celular, en agua y oxígeno.

El mecanismo completo de la catalasa no se conoce, pero se sabe que la reacción química se produce en dos etapas:



donde Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima que actúa como cofactor.

2.2.2 Sistema antioxidante no enzimático

Glutación

El glutación es un tripéptido formado por tres aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína. Se encuentra en la mayoría de formas de vida aerobia. No es requerido en la dieta y es sintetizado en las células desde sus aminoácidos constitutivos. Las características antioxidantes del glutación se deben al grupo tiol en su porción de cisteína, el cual es un agente reductor y puede ser oxidado y reducido de forma reversible.

El glutación existe en estado reducido (GSH) y oxidado (GSSG). En el estado reducido, el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un equivalente de reducción a otras moléculas inestables, como las especies reactivas de oxígeno. En la donación de un electrón el glutación se convierte en reactivo, pero reacciona rápidamente con otro glutación reactivo para formar disulfuro de glutación (GSSG). Esta reacción es posible debido a la concentración relativamente alta de glutación en las células. El GSH puede regenerarse a partir de GSSH por la acción de la enzima glutación reductasa (*Meister, A. 1988; 263:1720-5*).

Debido a su alta concentración y su papel central en mantener el estado redox de la célula, el glutación es uno de los antioxidantes más importantes (*Meister, A. 1988; 263:1720-5*).

2.2.3 Sistema antioxidante exógeno

A este grupo pertenecen todos los antioxidantes provenientes de la dieta, entre ellos la vitamina E, vitamina C, los carotenoides y los polifenoles.

Carotenoides

Son un grupo de pigmentos rojos, naranjas y amarillos responsables de la coloración de algunas frutas, verduras, insectos, aves y algunos crustáceos. Se ha hipotetizado que juegan un papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer (*Olguin, G. 2004; 12:199-206*).

Dos carotenoides dietarios importantes son el licopeno y el β -caroteno. Estos están involucrados en la eliminación de dos de las especies reactivas del oxígeno, el oxígeno singlete y el radical peroxilo (OOH). Además son efectivos desactivando moléculas excitadas electrónicamente las cuales están involucradas en la generación tanto de radicales como del propio oxígeno singlete. La inactivación del oxígeno singlete por los carotenoides, ocurre a través de dos mecanismos, tanto físicos como químicos.

La interacción de los carotenoides con el oxígeno singlete, depende principalmente del mecanismo físico, lo cual implica la transferencia directa de energía entre ambas moléculas. La energía del oxígeno es transferida al carotenoide produciendo oxígeno molecular en su estado basal y caroteno triplete excitado. El carotenoide retorna a su estado basal, disipando esta energía a través de la interacción con el solvente a su alrededor.

El mecanismo químico de la interacción entre el oxígeno singlete y los carotenoides es de menor importancia, contribuyendo con menos del 0.05% de la tasa total de inactivación. El β -caroteno y otros carotenoides, son los más eficientes para la inactivación del oxígeno singlete. Su actividad está relacionada con el número de dobles enlaces conjugados presentes en la molécula (**Van Haften, R., et.al. 2003; 35:215-253**).

Bando y Col (2004), realizaron un experimento, usando ratones alimentados con β -caroteno, para determinar si este sirve como antioxidante en la piel expuesta a los rayos UV-A, actuando como inactivador del oxígeno singlete, encontrando que el β -caroteno dietario se acumula en la piel y actúa como agente protector contra el daño oxidativo inducido por las radiaciones UV-A.

Vitamina E

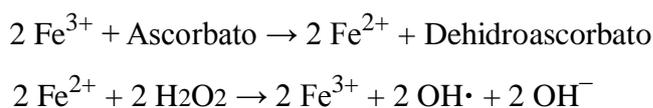
El término incluye varios tocoferoles y tocotrienoles que tienen actividad biológica similar. El alfa tocoferol es una vitamina liposoluble, principal antioxidante de las membranas celulares unida a la porción hidrofóbica del alfa tocoferol existe un grupo OH, cuyo hidrógeno puede removerse fácilmente y funcionar como donador de electrones. Los radicales peroxilos (OOH) generados durante la peroxidación lipídica extraen el hidrógeno de la molécula del tocoferol. El radical tocoferol resultante es poco reactivo por lo que detiene la reacción en cadena. El radical tocoferol migra hacia la superficie de la membrana y se genera en alfa tocoferol por una reacción del ácido ascórbico.

Vitamina C

Es una sustancia hidrosoluble y es el antioxidante más importante en los líquidos extracelulares. Su papel como antioxidante está basado en la reacción con los radicales de oxígeno y de nitrógeno, como el superóxido (O_2^-), radicales peroxilos (OOH^\cdot), oxígeno singlete y peroxinitritos ($ONOO^-$).

La vitamina C protege contra el daño oxidativo al ADN, proteína y contra la peroxidación lipídica. También tiene la capacidad de regenerar al tocoferol oxidado y a su vez, los radicales de ascorbato así generados, son reducidos nuevamente mediante diversos procesos bioquímicos dependientes de NADH. La regeneración de la capacidad antioxidante del ácido ascórbico requiere la unión con los sistemas reductores no radicales como glutatión o niacina. Dado que la vitamina C es un compuesto redox activo, puede actuar como antioxidante o prooxidante bajo ciertas circunstancias como con la presencia de metales de transición.

Los productos generados por estas reacciones llevan a la propagación de la peroxidación lipídica y la generación del radical hidroxilo. Ejemplo de la reacción prooxidante del ácido ascórbico es la siguiente:



Se produce primeramente la reducción del hierro férrico a ferroso, el cual posteriormente reacciona con el peróxido produciendo el radical libre hidroxilo.

Estudios epidemiológicos señalan al ácido ascórbico como benéfico en la prevención y progresión de enfermedades cardiovasculares, cáncer y cataratas, así también parece que pudiera disminuir la tensión arterial, mejorar la integridad del tejido vascular e incrementar su capacidad de relajación, aunque no existe una dosis recomendada para alcanzar estos objetivos y no se han obtenido efectos benéficos en todos los estudios clínicos. Se ha sugerido que la disminución en la concentración de vitamina C a nivel ocular, que se observa con el envejecimiento, pudiera ser responsable de la menor actividad de algunas enzimas antioxidantes, causante de cataratas y degeneración macular.

Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos se encuentran en pequeñas cantidades en frutas, vegetales y granos con actividad biológica entre la que destaca su actividad antioxidante, antiinflamatoria, como antiagregantes plaquetario y antitumoral. Los principales son ácidos fenólicos, flavonoides, derivados de la cumarina y antocianidinas. La actividad antioxidante de todos estos varía desde leve hasta muy fuerte. El modo de acción puede estar relacionado con una o más de las siguientes

funciones: capturadores de radicales libres, agentes reductores, quelantes o extinguidores de la formación del oxígeno singlete. Más adelante se detallará ampliamente sobre la acción de los polifenoles como antioxidantes (*Olguin, G. 2004; 12:199-206*).

2.3 POLIFENOLES DEL *THEOBROMA CACAO* L.

El cacao es rico en polifenoles, principalmente en catequinas, epicatequinas y sus oligómeros procianidinas. El contenido total de polifenoles en un grano de cacao es de aproximadamente 6-8%, del peso seco del grano (*Zumbe, A. 1998; 23:94-102*). Los polifenoles, *in vitro*, han demostrado tener una gran actividad antioxidante como captadores de radicales libres. Sin embargo, se han desarrollado pocas investigaciones sobre la actividad de estos compuestos en sistemas biológicos.

Antes de explicar la acción de los polifenoles específicos del cacao en los sistemas biológicos es importante mencionar la clasificación y estructura de estos compuestos.

2.3.1 Clasificación de los polifenoles

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Los polifenoles se subdividen en taninos, ligninas y flavonoides (**Esquema 2, Anexo 3**), estos son metabolitos secundarios de las plantas que cumplen funciones metabólicas importantes: son responsables de la resistencia de las plantas a la fotoxidación de la luz ultravioleta, intervienen en el transporte de la hormona auxina, y se cree que funcionan como defensa ante los organismos herbívoros. Además estos compuestos pueden atraer a los animales polinizadores, a través del color o el olor que le confieren a la planta o sus flores.

Williams, CA, Grayer, RJ. (2004; 21:239), divide a los polifenoles de forma general en polifenoles totales refiriéndose a estructuras unidas a azúcares o a proteínas y polifenoles libres y solubles, los cuales tienen sus grupos hidroxilos libres capaces de donar electrones con mayor facilidad en relación a los polifenoles totales.

En este estudio nos vamos a enfocar en los flavonoides, los cuales comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro y verde, el café, el cacao, la cerveza y el vino tinto.

2.3.2 Estructura de los flavonoides

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos, compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde 2' al 6' (**Figura 2, Anexo 4**). La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la reacción estructural entre las diferentes partes de la estructura química (*Martínez, S. 2002; 17: 271-278*).

Se han identificado y aislado alrededor de 9000 flavonoides, la variedad de estos se debe a que diez de los carbonos del esqueleto del flavonoide pueden ser sustituidos por una variedad de grupos diferentes, que pueden ser hidroxilados, metoxilados, metilados o benzilados. Además, cada grupo hidroxilo y algunos de los carbonos pueden ser sustituidos por uno o más azúcares puede ser acilado por una variedad de ácidos fenólicos. (*Williams, CA, Grayer, RJ. 2004; 21:239*).

Según Martínez, S. (20002), entre los flavonoides más importantes desde el punto de vista de actividad antioxidante están:

- Flavanos – como la catequina, con un grupo OH en posición 3 del anillo C. (**Figura 3, Anexo 5**).
- Flavonoles – representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3 del anillo C. (**Figura 4, Anexo 6**).
- Flavonas – como la diosmetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición 3. (**Figura 5, Anexo 7**).
- Antocianidinas, que tiene unido el grupo OH en posición 3 pero además, poseen un doble enlace entre los carbonos 2 y 4 del anillo C. (**Figura 6, Anexo 8**).

Los resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos en posiciones 3' y 4' del anillo B se muestran más activos como antioxidantes y este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo libre de OH en posición 3 y un grupo carbonilo en posición 4 en el anillo C. La quercetina presente estas cuatro características, mientras que las catequinas cumplen con dos de las características anteriores. (**Figura 7, Anexo 9**).

A los flavonoides se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente en formas de glucósidos. La parte sin azúcar de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glucósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres (*Martínez, S. 2002; 17:271-278*).

Muchas plantas almacenan los productos químicos importantes en forma de glucósidos inactivos; si estos productos químicos son necesarios, se hidrolizan en presencia de agua y una enzima, generando azúcares importantes en el metabolismo de la planta (*Martínez, S. 2002; 17:271-278*).

Numerosas enzimas pueden formar y romper enlaces glucosídicos. Las enzimas más importantes de este tipo son las glucósido hidrolasas, y las enzimas sintéticas más importantes de la naturaleza son las glucosiltransferasas.

2.3.3 Flavonoides en sistemas biológicos

Los flavonoides, en numerosos ensayos *in vitro*, han demostrado tener una gran actividad antioxidante en la captación e inhibición de radicales libres, sin embargo, para demostrar su eficacia en sistemas biológicos es importante tener en cuenta su actividad en el tracto digestivo y su biodisponibilidad. Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, la ingesta de flavonoides se estima en 23 mg/día (*Wollgast, J. 2000; 33:423-447*).

2.3.4 Biodisponibilidad de los flavonoides

Lamentablemente se tiene muy poca información sobre la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los flavonoides en humanos. Se sabe que la absorción y el metabolismo de los flavonoides en el cuerpo humano están determinados primeramente por su estructura química, el tamaño de la molécula, así como las reacciones de glucosilación y acetilación que sufren, el grado de polimerización y solubilidad. En lo que respecta a las catequinas y las procianidinas se encuentran principalmente en forma de agliconas en plantas y derivados de plantas, y su absorción está determinada por el tamaño de la molécula y su solubilidad (*Bravo, L. 1998; 56:317-333*).

Los flavonoides, sufren reacciones de biotransformación de fase I en el hígado, en la que se exponen los grupos polares; y en segundo lugar se dan las reacciones de biotransformación de fase II en el colon, donde los microorganismos degradan los flavonoides no absorbidos (*Martínez S. 2002; 17:271-278*).

En el hígado los grupos hidroxilo de las moléculas intactas de los flavonoides reaccionan con el ácido glucurónico o sulfatos, dando origen a conjugados. Los conjugados solubles en agua se excretan por la orina (*Heilmann, J., & Merfort, I. 1998; 27:173-183*).

Por su parte, en el colon, la flora microbiana normal hidroliza los polifenoles totales (unidos a azúcares), para posibilitar la absorción de las agliconas liberadas. Así los polifenoles pueden ser reabsorbidos y entrar en el ciclo enterohepático. Sin embargo los microorganismos también pueden degradar los flavonoides, rompiendo el anillo heterocíclico, obteniendo como producto diferentes ácidos fenólicos. Los ácidos fenólicos se excretan por la orina (*Heilmann, J., & Merfort, I. 1998; 27:173-183*).

La permanencia de polifenoles en el organismo es de gran importancia, debido a que los efectos fisiológicos de los polifenoles dependen de su distribución en el mismo. Los niveles más altos de catequina en sangre se presentan al cabo de 2 horas de la ingesta de catequinas presentes en el té verde y negro, y su vida media varía entre 4.8 y 6.9 horas. La concentración plasmática total de catequinas es de 0.17 mmol/l y más de 0.55 mmol/l en el té negro y verde respectivamente (*Van het Hof, K. H., Kivitis, et.al. 1998; 13:186-194*).

Otro aspecto importante de la biodisponibilidad de los flavonoides es que, los polifenoles pueden formar complejos con proteínas, lo cual podría dificultar la absorción de estos en el sistema gastrointestinal y afectar la actividad antioxidante de los flavonoides. (*Hollman, P. C. H., Tijburg, L. B. M., & Yang, C. S. 1997; 37:719-738*).

2.3.5 Flavonoides y sus beneficios para la salud

Las procianidinas del cacao, *in vitro*, han demostrado una actividad antioxidante y quelante importante en la prevención de la peroxidación lipídica de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) responsables del desarrollo de la arteriosclerosis. Aunque los compuestos fenólicos inhiben la oxidación lipídica, el efecto más importante es la modulación de la liberación del óxido nítrico con lo cual se regula la presión arterial, se inhibe la agregación plaquetaria y la adición de monocitos, factores involucrados en la progresión de la aterosclerosis (*Romanczyk, L. J., Hammerstone, J. 1997; 24: 138-145*).

Por otra parte, las procianidinas también actúan como agentes anticancerígenos, principalmente inhibiendo la ruptura del ADN y la oxidación de los nucleótidos por radicales libres. Además inhiben la actividad de las enzimas ciclooxigenasas 2 (COX-2) que cataliza la síntesis de prostaglandinas como la prostaglandina E2 o dinoprostona (PGE2) que estimula la angiogénesis y la progresión tumoral.

Además las procianidinas modulan la liberación de óxido nítrico por los macrófagos, inhibiendo la actividad del óxido nítrico sintasa (iNOS) lo cual afecta al ARN reductasa, responsable de la transformación de ribonucleótidos en desoxiribonucleótidos, monómero necesario para la síntesis del ADN. Se cree que la inhibición de la síntesis del ADN podría ser un mecanismo importante por medio del cual los macrófagos y otros tejidos que poseen iNOS inhiben el rápido crecimiento y división celular de células cancerígenas (*Romanczyk, L. J., Hammerstone, J. 1997; 24: 138-145*).

En relación a la actividad antiinflamatoria, los flavonoides inhiben la acción de fosfolipasas A2, ciclooxigenasas y lipooxigenasas lo cual produce una disminución de la síntesis de prostaglandinas PGE2 que interviene en la respuesta inflamatoria.

También, la ingesta de altos contenidos de flavonoides ha sido relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares y accidente cerebrovascular. Un estudio realizado a la población holandesa, demostró que el grupo de la población que ingería alimentos con altos contenidos de flavonoides tenía menor riesgo de padecer enfermedades cardiacas en relación a la población que no consumía flavonoides, con un 65% de disminución de la mortalidad (*Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC 1993; 342:1007-11*).

2.3.6 Actividad antioxidante de flavonoides

La determinación de la actividad antioxidante de compuestos fenólicos, en especial de flavonoides, requiere primeramente la extracción de estos compuestos y su cuantificación. La extracción de polifenoles se realiza usando un disolvente orgánico, como el metanol y la cuantificación de polifenoles totales se obtiene por el método de Folin-Ciocalteu (F-C) el cual mide la capacidad reductora total de la muestra a través de la reacción química de oxidación-reducción entre flavonoides y el reactivo F-C, la concentración total de polifenoles se expresa en equivalentes de ácido gálico (**Anexo 10**).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante de los flavonoides *in vitro*. Una de las estrategias 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 actividad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Arena, E., *et.al.* 2001; 74:423-427).

Alternativamente, diversos compuestos cromógenos (ABT, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados en la determinación de la actividad antioxidante de polifenoles, para captar los radicales libres generados, operando en contra los efectos perjudiciales de los procesos de oxidación, que implican las especies reactivas de oxígeno (EROS) (Arnous, A., *et.al.* 2002; 15:655-665).

Los métodos más aplicados para la determinación de la actividad antioxidante de polifenoles son el ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) y DPPH (1,1-dephenyl-2-pycrylhydrazyl). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH 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 potasio, ABAP), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también eletroquímica (Antolovich, M., *et.al.* 2002; 127:183-198).

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, además, 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 (Antolovich, M., *et.al.* 2002; 127:183-198).

La actividad antioxidante de compuestos fenólicos se determina a través del método de DPPH el cual indica el porcentaje de decoloración del radical DPPH al estar en contacto con una sustancia antioxidante, este valor se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$\%Decoloracion\ DPPH = 1 \frac{Am - Abm}{DPPH} \times 100$$

Donde Am es la absorbancia de la mezcla de reacción (DPPH + extracto), Abm la del blanco de la muestra (extracto + agua), y DPPH la absorbancia de DPPH (Anexo 11).

A través de este método también se puede determinar el valor de IC₅₀ (Half Maximal Inhibitory Concentration), que se define como la cantidad de una droga o sustancia requerida para inhibir la acción de otro compuesto, en este caso el radical DPPH, en un 50%.

2.4 RADICALES LIBRES (RL)

Los radicales libres son átomos o moléculas inestables que contienen un o más electrones desapareados o impares en su órbita externa y que pueden existir en forma independiente. Los radicales libres en su intento por completar sus pares de electrones, interaccionan con moléculas adyacentes quitándoles electrones y formando, como en una reacción en cadena, nuevos radicales libres (*Olguin, G, et.al. 2004; 12:199-206*).

La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que este a su alrededor provocando daños a las moléculas y a las membranas celulares (*Avello, M., et.al. 1999; 1-6*).

Los radicales libres se forman normalmente en el cuerpo, las fuentes mas importantes son el metabolismo aeróbico a través de la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial, así como la oxidación de ácidos grasos, reacción de citocromo P450, y las células fagocíticas. Existen además enzimas capaces de generar radicales libres bajo condiciones normales o patológicas así como fuentes exógenas como el humo del tabaco, la radiación, la luz ultravioleta, ciertos fármacos, solventes industriales (*Olguin, G, et.al. 2004; 12:199-206*).

Está demostrado que los malos hábitos alimenticios basados en dietas hipercalóricas e hipergrasosas son también causantes de la formación de radicales libres, por ello el gran interés en promover dietas balanceadas y saludables a base de frutas y verduras con altos contenidos de antioxidantes para lograr un balance oxidativo.

Los radicales libres no solo tienen efectos nocivos, juegan un papel importante en la regulación de la respuesta inmunológica de defensa relacionados a la inactivación de virus y eliminación de bacterias y hongos. Por ello se debe de considerar que son benéficos o tóxicos en dependencia de su concentración y de los factores que lo inducen. Cuando la formación de radicales libres excede la capacidad antioxidante de defensa se produce un desbalance oxidativo que se traduce en daño a las moléculas biológicas. El ataque a los grupos funcionales de las proteínas, provoca oxidación de aminoácidos y modificación de las proteínas como fragmentación y agregación.

Los radicales libres también pueden atacar membranas, lipoproteínas o ADN, provocando carcinogénesis, enfermedad aterosclerosa, disfunción cognitiva o envejecimiento, entre otras (Olguin, G, et.al. 2004; 12:199-206)

En nuestro cuerpo existen células que se renuevan continuamente como las células de la piel del intestino, y el de hígado y otras sin capacidad de renovación como las neuronas. En el transcurso de los años, los radicales libres pueden producir una alteración genética sobre las células que se dividen continuamente contribuyendo a aumentar el riesgo de cáncer por mutaciones genéticas o bien, disminuyen la funcionalidad de las células que no se dividen tanto, disminuyendo el número de mitocondrias, que es característico del envejecimiento (Olguin, G, et.al. 2004; 12:199-206).

2.4.1 Tipos de radicales libres

Los radicales libres se pueden clasificar según varios criterios, en dependencia del número de átomos desapareados, según el átomo central que posee el electrón impar y según la carga del radical.

Según el átomo central que posee el electrón impar

Dependiendo de cuál sea el átomo central que posee el electrón desapareado, los radicales pueden ser:

1. *Radicales centrados en el carbono:* como un radical alquilo (por ejemplo, el radical metilo $\cdot\text{CH}_3$), o un radical arilo. Dentro de los radicales centrados en C conviene distinguir, según sea el carbono que porta el electrón desapareado, entre radicales primarios (como el radical metilo $\cdot\text{CH}_3$) radicales secundarios; y radicales terciarios (como el radical trifenilmetilo). Los radicales terciarios son más estables que los secundarios, y éstos a su vez son más estables que los primarios.
2. *Radicales centrados en el nitrógeno:* como el radical nitrato $\cdot\text{NO}_3$
3. *Radicales centrados en el oxígeno:* como el radical hidroxilo $\cdot\text{OH}$, muy reactivo.
4. *Radicales centrados en átomo de halógeno:* como el radical cloro $\text{Cl}\cdot$
5. *Radicales centrados en átomo de metal:* como el radical $\cdot\text{SnH}_3$

Según el número de átomos

Los radicales pueden ser:

- ***Monoatómicos***, como el radical cloro **Cl•**, el radical bromo **Br•**, o el radical hidrógeno **H•**, que son simplemente átomos o iones con un número impar de electrones.
- ***Poliatómicos***, formados por más de un átomo, como el radical metilo, **CH₃•**

Según la carga

Los radicales pueden ser neutros, aniónicos o catiónicos, según que no posean carga; o que ésta sea negativa o positiva.

2.4.2 Formación de radicales libres en el organismo

En el cuerpo humano el principal responsable de la formación de radicales libres es el oxígeno, a pesar de ser indispensable para la vida es capaz de dar origen a especies reactivas de oxígeno (ERO) que producen daños severos en el organismo.

Según *Cotran, S. (2000; 1-50)*, los radicales libres se pueden iniciar en la célula mediante:

- ***Absorción de energía radiante*** - entre ellos la luz ultravioleta, los rayos X, los rayos gamma entre otros. La radiación ionizante puede hidrolizar el agua en radicales libres hidroxilo (**OH•**) e hidrógeno (**H•**).
- ***Metabolismo enzimático de productos químicos o fármacos exógenos*** - como por ejemplo el CCl₄ que genera el radical CCl₃•.
- ***Reacciones reducción-oxidación producidos durante los procesos metabólicos normales***- durante la respiración normal, el oxígeno molecular es reducido secuencialmente mediante la adición de cuatro electrones para generar agua. En este proceso, se producen pequeñas cantidades de productos intermedios tóxicos: entre ellos se incluyen el radical anión superóxido (O₂⁻), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y los iones hidroxilo (OH•). Además, algunas oxidasas intracelulares como la xantina oxidasa generan radicales superóxido como consecuencia de su actividad.

- **Los metales de transición** como el hierro y el cobre donan o aceptan electrones libres durante las reacciones intracelulares y catalizan la formación de radicales libres, como ocurre en la reacción de Fenton ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} = \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\cdot + \text{OH}^-$). Debido a que la mayor parte del hierro libre intracelular está en forma férrica, debe ser reducido en primer lugar a la forma ferrosa para participar en la reacción de Fenton. Esta reducción se puede potenciar por el superóxido y, por tanto, para una lesión celular oxidativa máxima son necesarios el hierro y el superóxido.
- **El óxido nítrico (NO)** – es un mediador químico importante generado por células endoteliales, macrófagos, neuronas y otros tipos celulares, puede actuar como radical libre y también puede ser convertido en la forma intensamente reactiva de anión peroxinitrito (ONOO^-), así como en NO_2^\cdot y en NO_3^- .

2.4.3 Efectos producidos por los radicales libres

Si bien es cierto que los radicales libres son elementos fundamentales en el metabolismo, también constituyen un riesgo, especialmente para las grandes moléculas. Es así como los ácidos nucleicos, las proteínas, los carbohidratos polimerizados (polisacáridos) y los lípidos, son preferentemente dañados por los radicales libres oxigenados.

Cotran, S. (2000; 1-50), establece tres reacciones que son especialmente relevantes para la lesión celular:

- **Peroxidación de los lípidos de la membrana** – los radicales libres en presencia de oxígeno pueden dar lugar a peroxidación de los lípidos dentro de las membranas plasmáticas y de los organelos. La lesión oxidativa se inicia cuando los radicales libres derivados del oxígeno, especialmente el OH^\cdot , atacan los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados de los lípidos de la membrana. Las interacciones lípido-radical dan lugar a peróxidos, que son inestables y reactivos, y se inicia una reacción en cadena autocatalítica que puede dar lugar a una intensa lesión de las membranas, los organelos y la célula.

- **Modificación oxidativa de las proteínas** – los radicales libres facilitan la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, la formación de enlaces cruzados proteína-proteína y la oxidación del esqueleto proteico que resulta en la fragmentación de la proteína. La modificación oxidativa incrementa la degradación de enzimas críticas por parte del complejo proteasoma multicatalítico, haciendo estragos en toda la célula.
- **Lesión en el ADN** – las reacciones con la timina en el ADN nuclear y mitocondrial producen fragmentaciones monocatenarias en el ADN. Esta lesión del ADN ha sido implicada en el envejecimiento celular y en la transformación maligna de las células (mutaciones genéticas responsables del desarrollo de cancer).

2.5 ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiopatías, enfermedades neurológicas, cáncer, etc. (*Avello M., Suwalsky M. 1999; 1-6*).

La reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los antioxidantes del cuerpo como glutatión, son la principal causa del estrés oxidativo. Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud de estos cambios, si la célula es capaz de superar las pequeñas perturbaciones y de recuperar su estado original. Sin embargo, el estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis (*Avello M., Suwalsky M. 1999; 1-6*).

Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas de oxígeno, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. Algunas de las menos reactivas de estas especies (como el superóxido) pueden ser convertidas por una reacción redox con metales de transición u otros compuestos de ciclo redox en quinonas, especie radical más agresiva que puede causar extenso daño celular.

La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, bajo los graves niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada, provocando que la célula simplemente se desintegre (*Avello M., Suwalsky M. 1999; 1-6*).

2.5.1 Orígenes del estrés oxidativo a nivel celular

El principal generador de especies reactivas de oxígeno en el organismo es la mitocondria. Las mitocondrias se describen como “generadores de energía” de las células, debido a que producen la mayor parte de suministro de adenosín trifosfato (ATP), que se utiliza como fuente de energía química. Además de proporcionar energía a la célula, las mitocondrias están implicadas en otros procesos, como la señalización celular, diferenciación celular, muerte celular programada, así como el control del ciclo celular y el crecimiento celular (*Avello M., Suwalsky M. 1999; 1-6*).

La principal ruta metabólica de producción de ATP es la fosforilación oxidativa, debido a que constituye la forma más eficaz de liberación de energía en comparación con procesos alternativos como la fermentación. Durante la cadena de transporte de electrones, los electrones son transferidos desde un donante de electrones a un aceptor de electrones, como el oxígeno, a través de reacciones redox. Estas reacciones liberan energía, la cual se utiliza para producir ATP (*Avello M., Suwalsky M. 1999; 1-6*).

Las fuentes de energía como la glucosa son inicialmente metabolizados en el citoplasma y los productos obtenidos son llevados al interior de la mitocondria donde se continua el catabolismo usando diferentes rutas metabólicas (ciclo de ácidos tricarboxílicos, beta oxidación de ácidos grasos y la oxidación de aminoácidos) para llegar a la producción de dos donadores de electrones NADH y FADH. Los electrones de estos dos donadores son pasados a través de la Cadena de electrones hasta el oxígeno, el cual se reduce para formar agua. Estas reacciones liberan la energía requerida para la síntesis de ATP (*Cortan, S., et.al. 2000; 1-50*).

Mientras el transporte de electrones ocurre con una alta eficacia, un pequeño porcentaje de electrones son prematuramente extraídos del oxígeno, resultando en la formación de un radical tóxico; el superóxido. Esto podría producir daños en el ADN mitocondrial, enfermedades degenerativas relacionadas con el envejecimiento, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y las cardiopatías como consecuencia de los radicales libres formados en la mitocondria.

Con el tiempo un daño acumulativo en las mitocondrias precipita una disminución en la producción de ATP, al mismo tiempo que provoca un aumento de radicales libres, acelerando así la destrucción de componentes celulares. Cuando las células exigen más energía, pero están dañadas, funcionan con menor eficiencia. Posteriormente, los tejidos que estas conforman, y el cuerpo en general, comienzan a funcionar mal (*Avello M., Suwalsky M. 1999; 1-6*).

2.5.2 Enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo

Prácticamente, todas las patologías comienzan con alteraciones moleculares o estructurales en las células, por ello es muy importante mencionar los mecanismos de lesión celular antes de referirnos a patologías específicas.

Lesión y muerte celular

La célula normal está confinada en un rango muy estrecho de función y estructura por sus programas genéticos de metabolismo, diferenciación y especialización; por las restricciones de células vecinas, y por la disponibilidad de sustancias metabólicas. No obstante, es capaz de manejar las demandas fisiológicas normales (homeostasis). Los estímulos fisiológicos más excesivos y algunos estímulos patológicos pueden llevar a una serie de adaptaciones celulares fisiológicas y morfológicas, en las que alcanza un nuevo estado pero claramente alterado, preservando la viabilidad de la célula y modulando su función en respuesta a tales estímulos.

Si se exceden los límites de la respuesta adaptativa a un estímulo, o en ciertas circunstancias en las que la adaptación no es posible, se produce una serie de acontecimientos, denominada, lesión celular. La lesión celular es reversible hasta cierto punto, pero si el estímulo persiste y es lo suficientemente intenso desde el principio, la célula alcanza el “punto no retorno” lo que conlleva a una lesión celular irreversible y muerte celular (*Cortan, S., et.al. 2000; 1-50*).

Las causas de lesión celular son varias y forma parte de estas, las lesiones producidas por radicales libres derivados del oxígeno. Las células generan energía al reducir el oxígeno molecular a agua, durante este proceso, se sintetizan pequeñas cantidades de formas de oxígeno reactivo parcialmente reducidas como producto intermedio inevitable de la respiración mitocondrial. Algunas de estas formas son radicales libres que pueden alterar los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.

Por esa razón se le atribuye al estrés oxidativo la patogenia de enfermedades como la aterosclerosis, enfermedades cardíacas y neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y Alzheimer.

2.6 ATEROSCLEROSIS

La enfermedad aterosclerótica es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. En los últimos años el conocimiento de su patogenia ha aumentado, en especial en lo que se refiere al rol del endotelio en la homeostasis vascular. Dada su localización, el endotelio es blanco primario de las fuerzas mecánicas y de las alteraciones humorales relacionadas con los factores de riesgo cardiovascular, como el tabaquismo activo y pasivo, diabetes mellitus, hipertensión arterial, dislipidemia e hiperhomocisteinemia (*Iribarra V, Germain A. et. al. 2000; 128: 6-15*).

Estos factores de riesgo condicionan una alteración de las funciones normales del endotelio, favoreciendo a la vasoconstricción, a la agregación plaquetaria, y trombosis, aumento de la permeabilidad, adhesión y proliferación celular, condiciones que llevan finalmente a la formación de la placa aterosclerótica ya a su trombosis y/o ruptura (*Iribarra V, Germain A. et. al. 2000; 128: 6-15*).

La *disfunción endotelial* se define como la imposibilidad del vaso sanguíneo a aumentar su diámetro en respuesta a un estímulo conocido, debido a la insuficiente generación de agentes vasodilatadores en el endotelio. En arterias sanas se observa dilatación dependiente del endotelio en respuesta a estímulos vasoactivos, mientras que en diferentes estados patológicos se ha demostrado ausencia de este efecto vasodilatador, o incluso un efecto constrictor.

La vasorregulación ocurre como resultado de un equilibrio entre la liberación de factores relajadores y constrictores. El factor relajante predominante es el óxido nítrico (NO). Además de su rol vasodilatador, el NO (entre otras funciones) es un inhibidor de crecimiento y migración celular, de la expresión de moléculas proinflamatorias y de adhesión. Por este motivo, el endotelio normal

tiene funciones anti-trombóticas y anti-ateroescleróticas, inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión de monocitos y la proliferación del músculo liso vascular, todos factores de importancia en el desarrollo de aterosclerosis y disrupción de la placa aterosclerótica.

Los radicales libres presentes en el organismo forman parte de los factores que condicionan la disfunción endotelial, y por consiguiente el desarrollo de la aterosclerosis. Sabiendo que la lesión endotelial es la primer anomalía que se detecta en los vasos sanguíneos que acaban con una aterosclerosis y que los radicales libres son causantes de esta lesión, es muy lógico pensar que los antioxidantes pudieran prevenir en alguna medida el desarrollo de la aterosclerosis (*Iribarra V, Germain A. et. al. 2000; 128: 6-15*).

2.7 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es un trastorno degenerativo y lentamente progresivo del sistema nervioso, producida por la degeneración celular de la sustancia negra del mesencéfalo y la disfunción de los circuitos neuronales relacionados con el control de los movimientos corporal (*Berkow R., Beers M., Fletcher A., et.al. 2001; 338-341*).

La enfermedad se caracteriza por los siguientes síntomas: rigidez de gran parte de la musculatura corporal; temblor involuntario de las zonas afectadas a un ritmo fijo de 3 a 6 ciclos por segundo, incluso cuando la persona esta en reposo y problemas serios para iniciar el movimiento, denominado, acinesia (*Cortan, S., et.al. 2000; 1-50*).

La sustancia negra es un elemento importante en el sistema de ganglios basales que son los responsables de la coordinación de los movimientos, esto se realiza a través de neurotransmisores químicos en forma de impulsos eléctricos por las vías nerviosas. La dopamina es el principal neurotransmisor de los ganglios basales.

En la enfermedad de Parkinson se produce una degeneración en las células de los ganglios basales, que ocasionan una pérdida o interferencia en la acción de la dopamina y menos conexión con otras células nerviosas y músculo. La causa de la degeneración de células nerviosas y de la pérdida de dopamina habitualmente no se conoce (*Berkow R., Beers M., Fletcher A., et.al. 2001; 338-341*).

Se conocen diversos procesos probablemente implicados en la producción del daño neuronal. Entre ellos la formación de radicales libres, estos al ser compuestos inestables por carecer de un electrón, reaccionan con moléculas circundantes, en un intento por reemplazar el electrón que falta, conduciendo hacia la oxidación. Se considera que la oxidación ocasiona daño a los tejidos, incluidas las neuronas. Las pruebas de que los mecanismos oxidativos pueden ocasionar o contribuir a la enfermedad de Parkinson incluye el hallazgo de que los pacientes con la enfermedad tienen niveles elevados de hierro en el cerebro, en especial en la materia gris, y niveles decrecientes de ferritina, que sirve como mecanismo protector (*Berkow R., Beers M., Fletcher A., et.al. 2001; 338-341*).

Para forzar la teoría anterior, se ha encontrado también, que los niveles de glutatión reducido (GSH) están disminuidos en el cerebro de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP). Este déficit es específico de la sustancia negra y no se encuentra en otras regiones cerebrales ni en otras enfermedades neurodegenerativas que afectan a los ganglios basales. El déficit de GSH puede reducir la captación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y promover la formación de radicales hidroxilo (**OH**), en una reacción catalizada por el hierro. No se conoce la causa por la que los niveles de GSH están disminuidos en la EP.

Otro aspecto que se ha encontrado en pacientes que sufren esta enfermedad es una disminución en la actividad de la glutatión peroxidasa. La glutatión peroxidasa es una enzima encargada de eliminar el peróxido de hidrógeno del organismo, y se encuentra localizada exclusivamente en astrocitos, que son las principales y más numerosas de células gliales. Por tanto, las neuronas dopaminérgicas rodeadas de una baja densidad de células gliales estarán menos protegidas frente a la producción de peróxido de hidrógeno, mientras que aquellas localizadas en áreas con gran componente glial, estarán más protegidas (*Berkow R., Beers M., Fletcher A., et.al. 2001; 338-341*).

En los homogeneizados de la sustancia negra de pacientes parkinsonianos se ha encontrado además un aumento en la actividad superóxido dismutasa (SOD). La SOD, junto con la catalasa y la glutatión peroxidasa, son las enzimas responsables de la degradación del O_2^- y el H_2O_2 , lo cual sugiere una mayor concentración de radicales libres en los pacientes que padecen de esta enfermedad (*Boletín de información farmacoterapéutica de Navarra, 2010*).

2.8. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer es un trastorno neurodegenerativo de carácter progresivo y mortal que desemboca en una deficiencia de capacidades de una persona para realizar sus actividades cotidianas, así como en una diversidad de síntomas neuropsiquiátricos y problemas del comportamiento durante las etapas finales de su evolución (*Cotran, S., Kumar V., et al. 2000;1-50*).

Se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que las células nerviosas mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian. La enfermedad suele tener una duración media aproximada después del diagnóstico de 10 años, aunque esto puede variar en proporción directa con la severidad de la enfermedad al momento del diagnóstico (*Asociación Española de Científicos, 2010*).

La investigación a lo largo de los últimos años, acerca de la Enfermedad de Alzheimer ha sido muy intensa y como resultado de ella se están postulando un gran número de hipótesis que ayudan a entender cada día más este complejo proceso neurodegenerativo. Si bien hoy en día no se conoce la etiología de esta enfermedad, todos los datos acumulados a lo largo de las últimas décadas apuntan a un conocimiento del origen de la misma cada vez más próximo (*Asociación Española de Científicos, 2010*).

Existen varias hipótesis que tratan de explicar este fenómeno: déficit de la acetilcolina, hipótesis excitotóxica, hipótesis del daño oxidativo y neuro-inflamatoria, acumulación de amiloide y/o tau. En este estudio nos vamos a enfocar en el daño oxidativo y su relación con el desarrollo de la Enfermedad de Alzheimer.

Daño oxidativo y Alzheimer

El sistema nervioso es particularmente sensible al daño mediado por los radicales libres debido a varias razones: el cerebro tiene un alto contenido de hierro (metal que participa en la generación de radicales libres), es rico en ácidos grasos muy susceptibles a la oxidación y, además, posee niveles bajos de defensas antioxidantes respecto de las halladas en otros órganos.

En cerebros de pacientes que murieron como consecuencia de la enfermedad de Alzheimer, se hallaron huellas de daño causado por radicales libres, por ejemplo, una mayor actividad de las enzimas antioxidantes -catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa-, lo cual sugiere que

existió una adaptación del tejido a una mayor producción de radicales libres, un contenido de hierro mayor que el normal, particularmente en aquellas áreas del cerebro que presentaban severos cambios degenerativos, y un aumento en la oxidación de varios componentes celulares (*Prado, C. 2000; 38:203-211*).

Estas alteraciones pueden ocasionar cambios en la estructura y/o la pérdida de la actividad normal de las moléculas biológicas, comprometiendo la función celular. La peroxidación lipídica-oxidación de los lípidos por efecto de los radicales libres- genera productos muy tóxicos, entre ellos el 4-hidroxi-nonenal, presente en altas concentraciones en el cerebro de individuos con enfermedad de Alzheimer y que, además, acorta la vida de neuronas en cultivo (*Prado, C. 2000; 38:203-211*).

Una explicación de los altos niveles de daño oxidativo hallado en individuos con enfermedad de Alzheimer se basa en que el amiloide beta se fragmenta, proceso en el cual se generan radicales libres peptídicos y otras especies oxidantes. Por otro lado, se ha descrito que en esta enfermedad está afectada la cadena mitocondrial de transporte de electrones, a través de la cual las células obtienen energía. Se sabe que este defecto, además de afectar el metabolismo energético de las neuronas, puede llevar a una mayor producción de radicales libres (*Asociación Española de Científicos, 2010*).

Todo lo descrito apoya la teoría de la participación de los radicales libres en la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo se desconoce si el daño oxidativo observado es una de las causas primarias de la degeneración neuronal o sólo la consecuencia metabólica de la muerte neuronal iniciada por otros factores. Aun cuando la producción elevada de radicales libres sea un evento secundario, su acción es nociva, ya que serían partícipes de la cascada metabólica que conduce a la muerte neuronal (*Asociación Española de Científicos, 2010*).

2.9 CÁNCER

El cáncer surge como consecuencia de una mutación o activación anormal de los genes celulares que controlan el crecimiento y la mitosis celular. Puede desarrollarse a partir de cualquier tejido dentro de cualquier órgano. A medida que las células de cáncer crecen y se multiplican, forman una masa de tejido canceroso que invade los tejidos adyacentes y puede propagarse por el cuerpo (metástasis).

Sólo una fracción diminuta de las células que mutan en el organismo producirá un cáncer alguna vez, la mayoría de las células mutadas tienen una capacidad de supervivencia menor que las células normales y, simplemente, mueren. Sólo algunas de las células mutadas que sobreviven son cancerosas, porque incluso la mayoría de las células mutadas tienen controles de retroalimentación normales que impiden su crecimiento excesivo (*Cotran, S., et.al. 2000; 1-50*).

Por otra parte, las células que son potencialmente cancerosas se destruyen, si no siempre, casi siempre, en el sistema inmunitario del organismo antes de que crezcan y desarrollen un cáncer, y esto se debe a que la mayoría de las células mutadas forman proteínas anormales en el interior de los cuerpos celulares como consecuencia de su alteración genética. Estas proteínas activan el sistema inmunitario del organismo, lo que hacen que generen anticuerpos o linfocitos sensibilizados que reaccionan contra las células cancerosas y las destruyen.

Además está demostrado que una única mutación en el material genético celular no es la responsable de transformar a una célula sana en cancerosa, por lo contrario, se requieren múltiples mutaciones, las cuales son generadas ya sea por sucesivos ciclos replicativos o por factores externos inductores de la carcinogénesis; en donde exista algún daño específicamente en la secuencia de exones de protooncogenes (genes susceptibles de sufrir mutaciones) y de genes supresores de tumores, que son los encargados de regular el ciclo celular y la muerte celular programada (apoptosis) respectivamente (*Cotran, S., et.al. 2000; 1-50*).

2.9.2 Factores que inciden a la aparición del cáncer

Las probabilidades de mutaciones en las células aumenta muchas veces cuando una persona se expone a determinados factores químicos, físicos o biológicos, como son los siguientes:

- La radiación ionizante, como los rayos X, los rayos gamma y la radiación de partículas procedentes de sustancias radioactivas, e incluso la luz ultravioleta, predisponen al cáncer. Los iones formados en las células tisulares bajo la influencia de este tipo de radiación son muy reactivos y pueden romper las cadenas de ADN, con lo que se provocan muchas mutaciones.
- Algunas sustancias químicas tienen también una mayor propensión a provocar mutación. Las sustancias químicas que provocan la mutación se denominan carcinógenos. Los carcinógenos que actualmente provocan el mayor número de muertes son los usados en diferentes industrias químicas como las refinerías, las fábricas de insecticidas y las minerías. Entre los químicos contaminantes esta el arsénico, el alquitrán, el benzopireno y el asbesto entre otros (*Cotran, S., et.al. 2000; 1-50*).

Otro agente cancerígeno importante es el contenido del humo de los cigarrillos (nicotina, óxidos de carbono, ácidos y alquitrán), que provocan aproximadamente la cuarta parte de todas las muertes por cáncer.

Los radicales libres presentes en el organismo pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer, puesto que estos son capaces de producir rupturas en la cadena de ADN con la consecuente mutación que junto con mutaciones producto de otros factores de riesgo incrementan la incidencia de padecer cáncer.

III. HIPÓTESIS

La actividad antioxidante de los granos de cacao provenientes de la RAAS, Río San Juan, Granada y productos alimenticios con contenido de cacao de Managua, depende directamente de la concentración de polifenoles presentes en él.

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de estudio

Se realizó un estudio con enfoque cuantitativo descriptivo, especificando las propiedades antioxidantes del *Theobroma cacao*, *in vitro*. Se presentan datos cuantitativos de la concentración de polifenoles totales y libres mediante la aplicación del método Folin-Ciocalteu, y datos sobre la actividad antioxidante de granos de cacao y productos alimenticios con contenido de cacao analizados en éste estudio.

Es una investigación no experimental debido a que no se manipulan deliberadamente las variables independientes y es de corte transversal puesto que las muestras de cacao fueron recolectadas en un tiempo único, comprendido en el mes de enero del 2010.

3.2 Población y muestra.

3.2.1 Población

El universo de las muestras de granos de cacao está constituido por las plantaciones de cacao procedentes de diversas fincas ubicadas en tres regiones diferentes del país. Se visitaron las fincas Santa Fe, Santa Eva, San Jorge, El Aguacate, El Coyal, El Socorro, Santa Rosa, La Humildad, La Pachango pertenecientes a la región del Río San Juan. De la Región Autónoma del Atlántico Sur (RAAS) se visitaron las fincas Los Laureles, La Lomita, Los Cocos y Mileto pertenecientes al municipio de Nueva Guinéa; las fincas Peoresnada, Argentina, San Isidro, San Antonio y Santa María ubicadas en el municipio del Rama; del municipio del Muelle de los Bueyes se visitaron Oro Blanco, Santa rosa, Peoresnada y San Isidro. Se visitó también la finca San Emilio ubicado en el departamento de Granada.

También forman parte del universo productos alimenticios a base de cacao presentes en los supermercados “La Colonia”, de Managua, los cuales constituyen productos en polvo y chocolates de diferentes empresas tanto nacionales como extranjeras.

3.2.2 Muestra

Las muestras fueron seleccionadas al azar, mediante la aplicación del muestreo aleatorio simple. Cada árbol fue referenciado satelitalmente y etiquetado con una cinta resistente, conteniendo información sobre el código de la muestra y la fecha de la recolección. De cada árbol se tomó un fruto, las cuales fueron seleccionadas por el tamaño y madurez de éste. Se muestrearon 24 árboles correspondientes a diferentes variedades de cacao (criollo e híbrido).

En cuanto a los productos alimenticios se tomaron como muestra cocoa en polvo de las siguientes marcas comerciales: Johnnys, Cocoa Dulce, Nesquik, Choco Choco, Cocoa Maya y una muestra de cacao en semilla proveniente del mercado Roberto Huembes. Las marcas de chocolate fueron: Hersheys, Cacao Criollo de Venezuela, Chocovic y El castillo del cacao de Matiguas, Matagalpa. En total se muestrearon 10 productos alimenticios con contenido de cacao, obtenidas de los supermercados “La Colonia” de Managua.

3.3 Variables del estudio

Variables independientes

- Edad
- Condiciones climáticas

Variables dependientes

- Cuantificación de polifenoles
- Actividad antioxidante

3.3.1 Operacionalización de Variables

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Indicador
Edad	Tiempo cronológico medido en años desde el nacimiento hasta la fecha de la muerte.	Tiempo de vida del árbol de cacao desde el día de su siembra.	Días, meses y años.
Condiciones climáticas	Elementos de la naturaleza que condicionan el crecimiento y desarrollo de todo lo vivo: humedad, temperatura, suelos, ubicación geográfica entre otros.	Condiciones de temperatura y humedad a la que fue expuesto el árbol de cacao durante su crecimiento.	Grados centígrados y porcentajes de humedad.
Cuantificación de polifenoles	Cantidad de polifenoles presentes en la muestra estudiada.	Cantidad de polifenoles presentes en el cacao, determinados como equivalentes de ácido gálico a través del método de Folin-Ciocalteu.	Microgramos por mililitro de Acido Gálico ($\mu\text{g/ml}$ ácido gálico)
Actividad antioxidante	Capacidad que tiene una sustancia de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres.	Capacidad que tienen los flavonoides de donar electrones a especies reactivas, oxidándose ellos mismos para prevenir la oxidación de biomoléculas.	Porcentaje de decoloración del radical DPPH

3.4 Materiales y métodos

3.5.1 Materiales para recolectar información

La información sobre la cuantificación y actividad antioxidante de granos de cacao y productos alimenticios con contenido de cacao fue recolectada mediante la aplicación de los métodos Folin-Ciocalteu y DPPH respectivamente.

3.4.2 Materiales para procesar información

Para analizar la información se trabajó una matriz en el programa Excel, los resultados se presentan en gráficos y tablas. Se realizó el análisis de los datos recolectados utilizando la técnica de cruce de variables.

Las tablas presentan información sobre el contenido y actividad antioxidante de polifenoles totales y polifenoles libres y solubles, rangos de concentración y porcentajes de las muestras analizadas.

Los gráficos comprenden porcentajes totales de las muestras en relación a las variables analizadas, comparación de los valores medios más altos de concentración y representación de la eficiencia de polifenoles para inhibir el radical DPPH en un 50%.

3.4.3 Métodos

Se utilizó el método cuantitativo basado en la espectrofotometría de absorción visible para la determinación de la concentración de antioxidantes y el cálculo de la actividad antioxidante. Por tanto el instrumento utilizado para ese fin fue el espectrofotómetro de absorción visible.

V. RESULTADOS

Los resultados que se reflejan en el presente trabajo, están organizadas según las variables de estudio. Se analizaron 24 muestras de granos de cacao no fermentados, frescos de cosechas recientes y almacenadas de cosechas anteriores, provenientes de tres regiones del país: Granada, Río San Juan y Región Autónoma del Atlántico Sur (RAAS). Además de estas muestras se analizaron 10 productos alimenticios con contenido de cacao: cocoa en polvo y chocolates, muestras comerciales obtenidas en el mercado Roberto Huembes y supermercado La Colonia.

Para la cuantificación de polifenoles las muestras se analizaron de acuerdo a dos métodos. El primer método fue para determinar la cantidad de polifenoles libres y solubles y el segundo para determinar los polifenoles totales.

La actividad antioxidante fue calculada a través del método de decoloración del radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) y los resultados se presentan como porcentaje de decoloración del dicho radical.

Polifenoles libres y solubles

Con respecto a la concentración de polifenoles libres y solubles expresado en $\mu\text{g/ml}$ de ácido gálico los valores oscilaron entre 230 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$, cantidades máximas y mínimas respectivamente. El mayor contenido de polifenoles libres y solubles fue encontrado en la muestra STE-AT-01, recolectada en el departamento de Granada y la muestra con la menor cantidad de polifenoles fue mTc MB 36, obtenida del municipio de Muelle de los Bueyes de la Región Autónoma del Atlántico Sur (RAAS). Se establecieron tres rangos de concentración: 230-150 $\mu\text{g/ml}$; 149-70 $\mu\text{g/ml}$ y 69-1 $\mu\text{g/ml}$, las cuales representan el 21%, 47% y 32% del total de muestras analizadas. (**Tabla 1., Anexo 12.**)

Los 7 valores más próximos al rango establecido de 230-150 $\mu\text{g/ml}$ fueron: 3 muestras del departamento de Granada, STE-AT-01 (230 $\mu\text{g/ml}$), STE-AT-02 (207.5 $\mu\text{g/ml}$), STE-AT-04 (170 $\mu\text{g/ml}$); 3 muestras del departamento de Río San Juan, mTc CA 25 (170 $\mu\text{g/ml}$), mTc GU 34 (160 $\mu\text{g/ml}$), mTc CA 09 (150 $\mu\text{g/ml}$); y 1 muestra de la RAAS, mTc RA 33 (162.5 $\mu\text{g/ml}$). (**Tabla 2., Anexo 13.**)

En relación a la actividad antioxidante de los polifenoles libres y solubles, se obtuvieron los porcentajes 88.1 y 14.42, correspondientes al valor máximo y mínimo respectivamente. La muestra que presentó el porcentaje más alto de actividad antioxidante fue STE-AT-04 obtenida del departamento de Granada y la muestra con el porcentaje más bajo fue mTc MB 36 del municipio de Muelle de los Bueyes de la RAAS. Se establecieron 4 rangos de porcentaje de actividad antioxidante: 88-83%, 82-77%, 76-70% y 69-15%, las cuales representan el 23.5%, 21%, 23.5% y 32% del total de las muestras analizadas. (**Tabla 3., Anexo 14.**)

Las muestras más representativas al porcentaje más altos de actividad antioxidante, según el rango de 88-83% establecido fueron: STE-AT-04 (88.1%) del departamento de Granada; chocolate “Cacao Criollo” de Venezuela (86.38%); 6 muestras del departamento de Río San Juan, mTc CA 27 (85.69%), mTc CA 25 (85.55%), mTc CA 09 (85.55%), mTc GU 34 (85.4%), mTC CA 13 (84.88%), mTc GU 43 (83.23%). (**Tabla 4., Anexo 15.**)

Polifenoles totales

En referencia a la concentración de polifenoles totales, la muestra que presentó la mayor cantidad de polifenoles totales fue mTc NG 04 con un valor de 60 µg/ml y la muestra con la menor cantidad de polifenoles totales fue Chocovic, Jade con un valor de 0.75 µg/ml. Se establecieron tres rangos de concentración: 60-48 µg/ml; 47-33 µg/ml y 32-0.75 µg/ml, las cuales representan el 29%, 21% y 50% del total de muestras analizadas. (**Tabla 5., Anexo 16.**)

Los valores más próximos registrados al rango de 60-48 µg/ml fueron: 6 muestras de la RAAS, mTc NG 04 (60 µg/ml), mTc RA 33 (57 µg/ml), mTc RA 25 (51 µg/ml), mTc MB 39 (51 µg/ml), mTc MB 35 (49 µg/ml), mTc RA 24 (48 µg/ml); 2 muestras del departamento de Río San Juan, mTc GU 43 (56), mTc CA 09 (49 µg/ml); 1 muestra del departamento de Granada, STE-AT-01 (49 µg/ml); y 1 muestra de cocoa de la marca comercial Maya (51.5 µg/ml). (**Tabla 6., Anexo 17.**)

Respecto a la actividad antioxidante de los polifenoles totales, la muestra mTc GU 43, recolectada de la RAAS presentó el mayor porcentaje de actividad antioxidante 85.12%, a diferencia de la muestra STE-AT-03 obtenida del departamento de Granada, la cual presento el porcentaje más bajo 31.53%. Se establecieron tres rangos de porcentaje de actividad antioxidante: 85-77%, 76-68% y 67-30%, las cuales representan el 24%, 26% y 50% respectivamente del total de las muestras analizadas. (**Tabla 7., Anexo 18.**)

Entre los 8 valores registrados en el rango de 85-77%, que presentaron mayor porcentaje de actividad antioxidante están: 7 muestras obtenidas del departamento de Río San Juan, mTc GU 43 (85.12%), mTc CA 13 (83.97%), mTc CA 09 (82.68%), mTc CA 25 (82.26%), mTc CA 27 (78.96%), mTc GU 34 (78.25%); y 1 muestra de la RAAS, mTc NG 04 (78.11%). **(Tabla 8., Anexo 19.)**

Con respecto al cálculo de IC_{50} , se analizaron 10 muestras, realizando mediciones al instante de la reacción, a los 10, 20 y 30 minutos. Las muestras que presentaron una inhibición del radical DPPH en un rango de 46-57% fueron: 2 muestras del departamento de Granada, STE-AT-01 (46.38%), STE-AT-04 (48.34%); 2 muestras del departamento de Río San Juan, mTc GU 34 (53.61%), mTc GU 43 (57.37%); y mTc RA 33 (51.35%), muestra recolectada de la RAAS. **(Tabla 9., Anexo 20.)**

En referencia a la cantidad de antioxidantes requerida de cada una de las 5 muestras antes mencionadas para inhibir la acción del radical DPPH en un 50% se obtuvo que la muestra STE-AT-01 con un valor de $IC_{50} = 0.052$ mg/ml es la más eficiente en cuanto a la captación del radical DPPH. La eficiencia de las muestras decrece en el siguiente orden: STE-AT-01 > STE-AT-04 > mTc RA33 > mTc GU 34 > mTc GU 43. **(Tabla 10., Anexo 21.)**

VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Al analizar los datos de la concentración de polifenoles totales y polifenoles libres y solubles se observa una diferencia notable en los valores registrados, lo cual se explica según *Wollgast J., et.al. (2000; 33:423-447)*, en factores bióticos y abióticos a los que está expuesto el árbol durante su crecimiento tales como humedad de los suelos, períodos lluviosos y secos, patógenos, entre otros.

El valor medio más alto de concentración de polifenoles libres y solubles es de 185 µg/ml perteneciente a las muestras recolectadas del departamento de Granada, seguidas de las muestras de Río San Juan con un valor medio de 130 µg/ml (**Tabla 11., Anexo 22.**), estas representan el 12% y 27% del total de muestras analizadas. (**Gráfico 1., Anexo 22.**)

Entre los valores más altos de concentración de polifenoles libres y solubles, se encuentran 3 muestras del departamento de Granada y 3 muestras del departamento de Río San Juan. Según lo observado durante la recolección, estos árboles estaban sometidos a estrés ambiental y a plagas del hongo *Monilia* respectivamente, lo cual podría explicar su alto contenido de polifenoles, ya que estos actúan como mecanismo de defensa ante el exceso de radiación solar y desarrollo de hongos.

Analizando las mazorcas de las muestras STE-AT-01 (**Foto 1., Anexo 29.**) obtenida de Granada y 3 muestras de Río San Juan mTc CA 25 (**Foto 2., Anexo 30.**), mTc GU 34 (**Foto 3., Anexo 31.**) y mTc CA 09 (**Foto 4., Anexo 32.**) se puede observar que estas presentan características de cacao criollo, por tener frutos de cáscara suave, borroñosos y con un ápice pronunciado y curvo, lo cual sugiere que pudiera haber un patrón genético que determina la producción de polifenoles.

En la investigaciones realizadas por *Vargas D., et.al (2006; 38:123-130)*, se presenta otro factor determinante de la concentración de polifenoles en plantas, como es la edad. Los frutos jóvenes al encontrarse en la etapa de crecimiento y desarrollo, presentan concentraciones muy bajas de polifenoles, en este caso de flavonoides. Los flavonoides aumentan conforme avanza la edad, siendo así los frutos maduros los que presentan la mayor concentración.

En cuanto a la concentración de polifenoles totales, el valor medio más alto lo presentaron las muestras de la RAAS y del departamento de Río San Juan con un valor de 39 µg/ml (**Tabla 12., Anexo 23.**), representando el 32 % y 27 % respectivamente del total de las muestras analizadas. (**Gráfico 2., Anexo 23.**)

Si se compara el valor medio más alto de la concentración de polifenoles libres y solubles con los polifenoles totales, se observa un descenso significativo de 185 µg/ml a 39 µg/ml, lo cual nos indica que el grano de cacao contiene una mayor concentración polifenoles libres y solubles. (**Gráfico 3., Anexo 24.**)

Según *Hollman P., et.al., (1997; 37:719-738)* la mayor concentración de polifenoles libres y solubles favorece a la biodisponibilidad de los flavonoides ya que los complejos formados ya sea con azúcares o con proteínas, dificultan la absorción de estos en el sistema gastrointestinal y afectan la actividad antioxidante.

Según la bibliografía consultada, *Arnous A., et.al. (2002; 15:655-665)*, la actividad antioxidante de una sustancia se determina por su capacidad de secuestro de un compuesto cromógeno, en este caso el radical DPPH y se expresa a través del porcentaje de decoloración de dicho radical. Así a mayor porcentaje de decoloración mayor actividad antioxidante.

En cuanto a la actividad antioxidante de polifenoles libres y solubles el 79% de las muestras analizadas presentaron una alta actividad antioxidante, en un rango de 88-65% (**Gráfico 4., Anexo 25.**) y en relación a los polifenoles totales el 59% de las muestras, en un rango de 85-65%, presentaron un alto porcentaje de secuestro del radical DPPH (**Gráfico 5., Anexo 26.**)

Lo anterior sugiere que los polifenoles libres y solubles son más reactivos frente a los radicales libres en relación con los polifenoles totales, cuyos grupos hidroxilo libres se encuentran enlazados con azúcares o proteínas, lo cual disminuye su capacidad de donar electrones.

Según *Wollgast J., et.al. (2000; 33:423-447)*, los procesos de fermentación y secado del grano de cacao, al igual que los procesos industriales de producción de chocolate, disminuyen considerablemente el contenido de polifenoles. Este aspecto se puede observar claramente en los productos comerciales analizados en el presente trabajo.

Los productos alimenticios con contenido de cacao, tales como cocoa en polvo, chocolates y cacao molido presentan concentraciones muy bajas de polifenoles en comparación con los granos no procesados. Los granos de cacao obtenidos del mercado Roberto Huembes (50.5 µg/ml) y cocoa en polvo de la marca “Maya” (50 µg/ml), presentan el mayor contenido de polifenoles libres y solubles.

Con respecto a los chocolates, el chocolate negro, como “El cacao criollo” (86.38%) y “El castillo del cacao” (78.61%) presenta mayor actividad antioxidante en comparación al chocolate con leche de la marca Hershey’s (43.8%) (**Anexo 15**). Por lo cual se sugiere consumir cocoa en polvo natural, sin ningún aditivo, y chocolate negro de más de 50%.

Analizando la muestra mTc MB 36, obtenida de la RAAS, el único ejemplar de *Theobroma bicor* con semilla blanca rica en grasas y fruto café marrón, se pudo observar que ésta se ubica en las últimas posiciones tanto en la concentración como en la actividad antioxidante de los polifenoles. Este hecho sugiere que la mayor concentración de polifenoles se encuentra en granos de color oscuro en contraposición con los granos color blanco que contienen muy bajo o ningún contenido de polifenoles. Resultado que se corresponde con las principales funciones de los polifenoles que es la coloración de los frutos y granos de las plantas, lo cual los hace más apetecibles para los organismos herbívoros (*Vargas D., et.al. 2000;38:123:128*).

En relación a la cantidad de polifenoles requerida para secuestrar el radical DPPH expresada en IC_{50} , se demostró que la muestra STE-AT-01 del departamento de Granada, presenta mayor captación del radical DPPH, con un valor de $IC_{50} = 0.052$. A menor IC_{50} mayor actividad antioxidante, es decir se requiere una cantidad mínima de polifenoles para secuestrar el radical DPPH en un 50%. (**Gráfico 6., Anexo 27.**)

Otro aspecto muy importante que hay que considerar, es la correlación entre la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles. *Padilla, F. (2008;58:303-308)* en su estudio afirma que no existe ninguna correlación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante. En las muestras analizadas en el presente estudio tampoco se encontró correspondencia entre estas dos mediciones. Este aspecto se explica, según *Padilla, F.*, en dependencia de tipos de polifenoles presentes en las muestras, que por su estructura pueden presentar mayor actividad antioxidante que otros.

En la tabla 15 (**Anexo 28.**) se puede observar que las mejores ocho muestras de granos de cacao con alta actividad antioxidante no corresponden a las mejores muestras de alta concentración de polifenoles, lo cual se puede explicar según *Padilla, F. (2008;58:303-308)*, en los diferentes tipos de polifenoles que pueden estar contenidos en las muestras de cacao presentando unos mejor actividad antioxidante en comparación a otros.

CONCLUSIONES

- Los valores más altos de actividad antioxidante obtenidos fueron, 88.1 % para los polifenoles libres y solubles, y 85.12 % para los polifenoles totales.
- El proceso agroindustrial provoca una pérdida del nivel de polifenoles, por lo que se recomienda iniciar el proceso industrial a partir de granos con alto contenido de polifenoles para compensar la pérdida de estos.
- Los granos de cacao contienen una mayor concentración de polifenoles libres y solubles en comparación con los polifenoles totales (unidos a azúcares).
- El contenido de polifenoles pareciera tener una alta dependencia genética influenciada por la zona ambiental donde se obtuvo la muestra.
- La concentración de polifenoles presentes en el cacao no tiene correlación con la actividad antioxidante.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios sobre los tipos de polifenoles presentes en las muestras de granos cacao y productos alimenticios derivados de éste.
- Determinar la biodisponibilidad de polifenoles presentes en las muestras de granos de cacao y productos alimenticios derivados de éste.
- Realizar pruebas de actividad antioxidante del cacao y sus derivados en poblaciones humanas.
- Valorar el papel de los antioxidantes en la prevención del estrés oxidativo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arena, E., *et.al.* (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.*, 74: 423-427.
2. Arnous, A., *et.al.* (2002). Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *J. Food Comp. Anal.*, 15: 655-665.
3. Antolovich, M., *et.al.* (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.*, 127:183-198.
4. Arthur, C., Guyton and John E. Hall, (2006). Tratado de fisiología médica, 11 edición, 848-851.
5. Avello, M., Suwalsky, M. (1999). Radicales libres, Estrés oxidativo y Defensa Antioxidante celular. *Universidad de Concepción*, Chile, p.p 1-6.
6. Berkow, R., Beers M., Fletcher A., *et.al.* (2001). Enfermedad de Parkinson, *Manual Merck*. Oceano, 338-341.
7. Berkow R., Beers M., Fletcher A., *et.al.* (2001). Aterosclerosis, *Manual Merck*, Oceano, 124-126.
8. Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
9. Corrales, V. (1999). Los radicales libres en la enfermedad de Alzheimer, *Ciencia Hoy*. vol.1, 32-36.
10. Coe, Sophie D., *et.al* (1996). The true history of chocolate, Tomas y Hudson. *History.*, vol. 3, 54-58.
11. Chun, W., Johnson, G.V. (2007). The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death, *Front. Biosci.*.vol. 12.pp.733-56.
12. Cotran, S., Kumar, V., *et al.* (2000). Patología Funcional y Estructural, 6ta edición, 1-50.

13. Elchuri, S., *et al.*(2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life, *Oncogene*, vol. 24, pp. 367-380.
14. Halliwell, B. (2007). Dietary polyphenols: Good, bad or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 73, 341-347.
15. Heilmann, J., & Merfort, I. (1998). Aktueller Kenntnisstand zum Metabolismus von Flavonoiden- II. Resorption und Metabolismus von Flavonen, Flavanonen, Flavanen, Proanthocyanidinen und Isoflavonoiden. *Pharmazie in unserer Zeit*, 27, 173-183.
16. Hernández, F., Avila, J. (2007). Tauopathies»*Cell. Mol. Life Sci.*.vol. 64.n.º 17, pp.2219–33.
17. Hertog, M.G, Feskens, E.J., Hollman, P.C., Katan, M.B., Kromhout, D. (2004). Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 1993; 342:1007–11.
18. Hollman, P. C. H., Tijburg, L. B. M., & Yang, C. S. (1997). Bioavailability of flavonoids from tea. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37, 719-738.
19. Irribarra, V., Germain, A., *et al.* (2000). Disfunción endotelial como alteración primaria en la patologías vasculares, *Revista Médica de Chile*, vol. 128: 6-15.
20. Lecumberri, E., *et al.* (2006). Caracterización de la fibra de cacao y su efecto sobre la capacidad antioxidante en suero de animales de experimentación, *Nutrición Hospitalaria*. 21:622-628.
21. Lima, L. (2000). Estrés oxidativo y antioxidantes: actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos. *Scielo*, 22:35-40, Habana, Cuba.
22. Li, Y., *et al.* (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* Vol. 11. pp. 376-381.
23. Martínez, S. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17:271-278.

24. Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification, *J Biol Chem*, vol. 263.n.º 33, pp.1720-5.
25. Menocal, O. (2005). El Cacao: Riqueza potencial de la tierra Nica a la espera de ser explotada comercialmente en los mercados internacionales, *INTA*, 1-15.
26. Osman, H., Nasarudin, R., *et.al.* (2004). Extracts of cocoa (*Theobroma cacao L.*) leaves and their antioxidation potencial. *Food Chemistry*. 86, 41-46.
27. Olguin, G., *et.al.* (2004). Antioxidantes y aterosclerosis, *Revista de Endocrinología y Nutrición*, vol.12, 4, 199-206.
28. Padilla, F., Rincón A., Bou-Rached. (2008). Contenido de polifenolesy actividad antioxidante de varias semillas y nueces. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 58(3): 303-308.
29. Peña, C. (2000). *Theobroma cacao L.*, *Species Plantarum*, vol. 2: 252-256.
30. Prado, C. (2000). Enfermedad de Alzheimer: causas y efectos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 38:203-211.
31. Romanczyk, L. J., Hammerstone, J. F., Buck, M. M., Post, L. S., Cipolla, G. G., Micceland, C. A., Mundt, J. A., & Schmitz, H. H. (1997). Cocoa extract compounds and methods for making and using the same. Patent Cooperation Treaty (PCT) WO 97/36497, USA, MARS Inc. Sanbongi, C., Suzuki, N, 24:138-145.
32. Tráncito, M. (2002). Fitoterapia: Flavonoides. *OFFARM*. 21(4): 108-114.
33. Van Haaften, R., Haenen, G. Evelo, C. and Bast, A. (2003). Effect of Vitamin E on Glutathione-Dependent Enzymes. *Drug Metabolism reviews* 35: 215–253.
34. Van het Hof, K. H., Kivitis, *et.al.* (1998). Polyphenols and Health. *Food Chemistry* 13:186-194.
35. Vargas D., *et.al.* (2000). Producción de polifenoles en plantas. *Scielo*, 38:123-128.

36. Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview, *Curr Pharm Des.* Vol. 10.n.º 14, 1677-9.
37. Wollgast, J. Anklam (2000). Review on polyphenols in *Theobroma cacao* : changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International*, 33, 423-447.
38. Williams, C.A., Grayer, R.J., (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* 21: 539-573.
39. Yu-Tang Tung *et.al.* (2007). Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. *Bioresource Technology*, 98:1120-23.
40. Zumbe, A. (1998). Polyphenols in cocoa: are there health benefits. *BNF Nutrition Bulletin*, 23, 94-102.
41. H. Sampieri, R. *el.al.* (2007). Metodología de la investigación. Cuarta edición. *Compañía Editorial Ultra, México.*

WEBGRAFÍA

1. CFNAVARRA (Boletín de información farmacoterapéutica de Navarra) [en línea]. Estrés oxidativo y enfermedad de Parkinson. [consultada 22/03/2010]. Disponible en internet: anales@cfnavarra.es.
2. AECientíficos (Asociación Española de Científicos) [en línea]. Enfermedad de Alzheimer. [consultada 07/03/2010]. Disponible en internet: www.aecientificos.es.

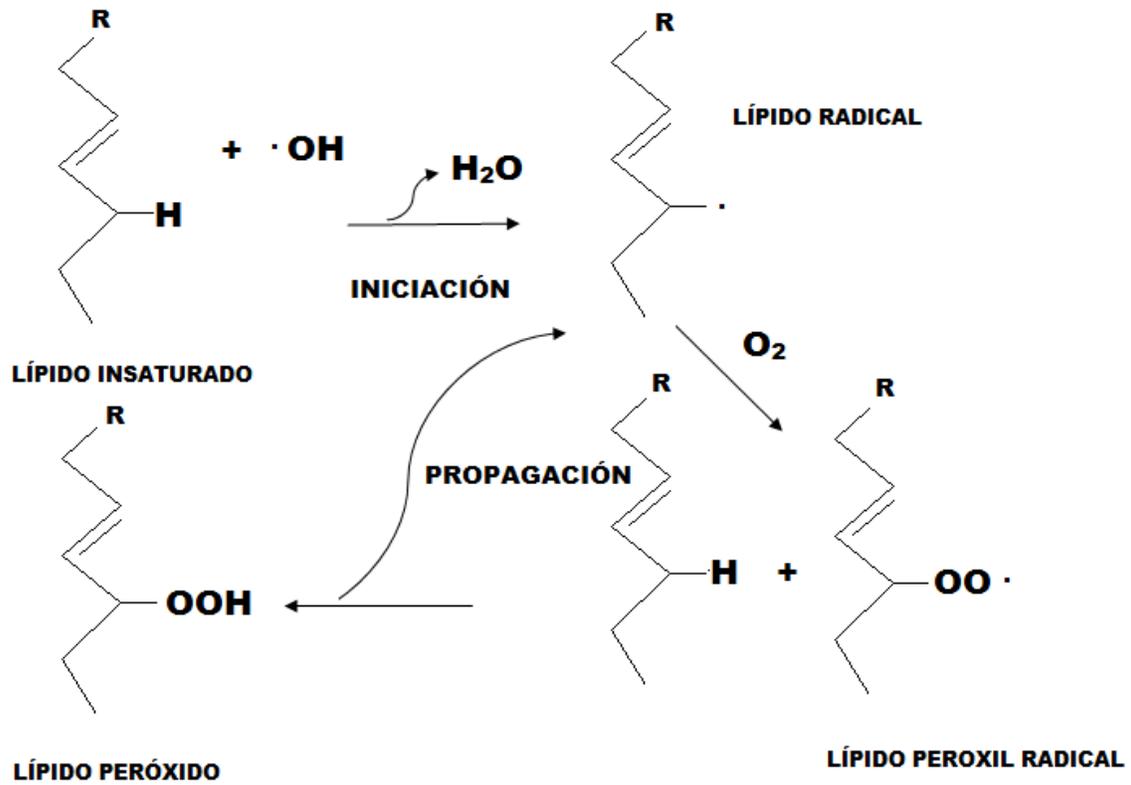
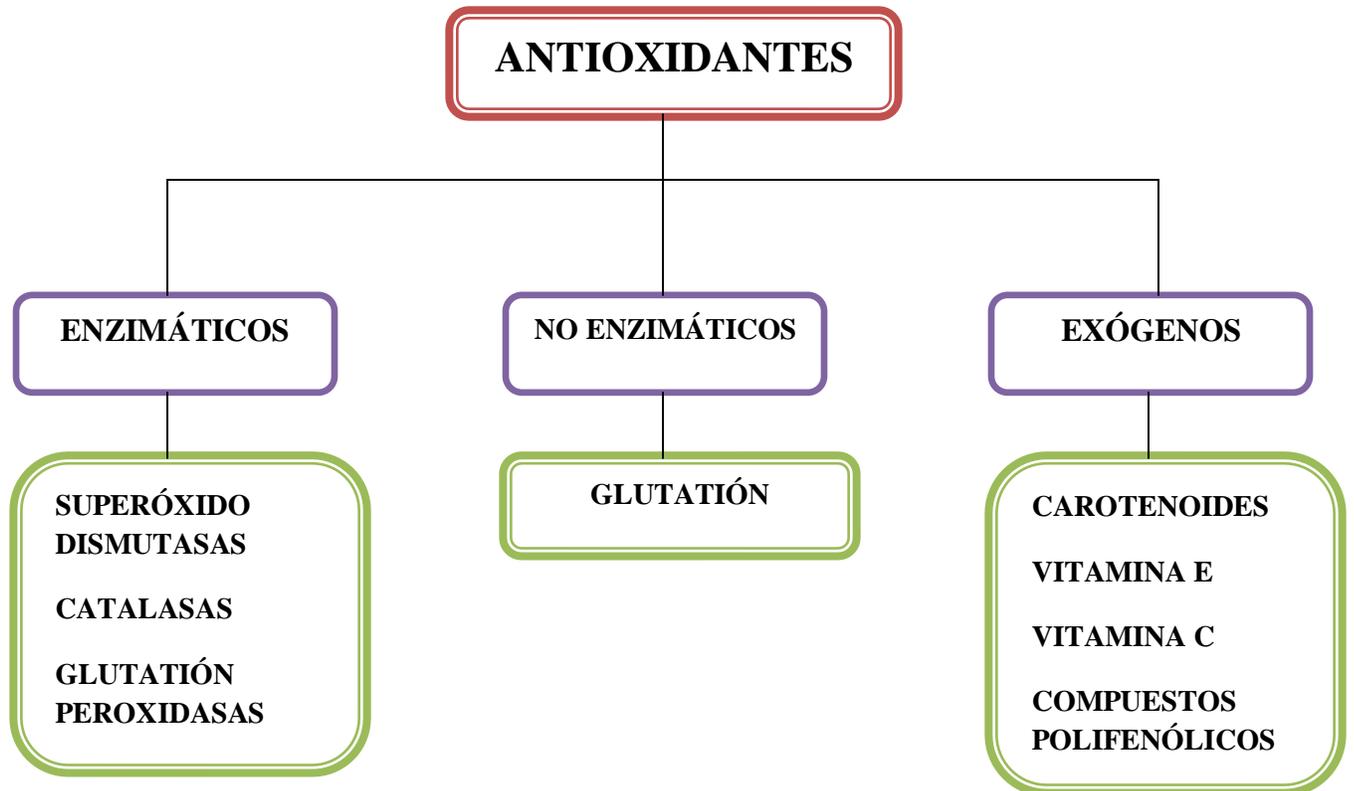


Figura 1. Mecanismo de la peroxidación lipídica iniciado por el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$).

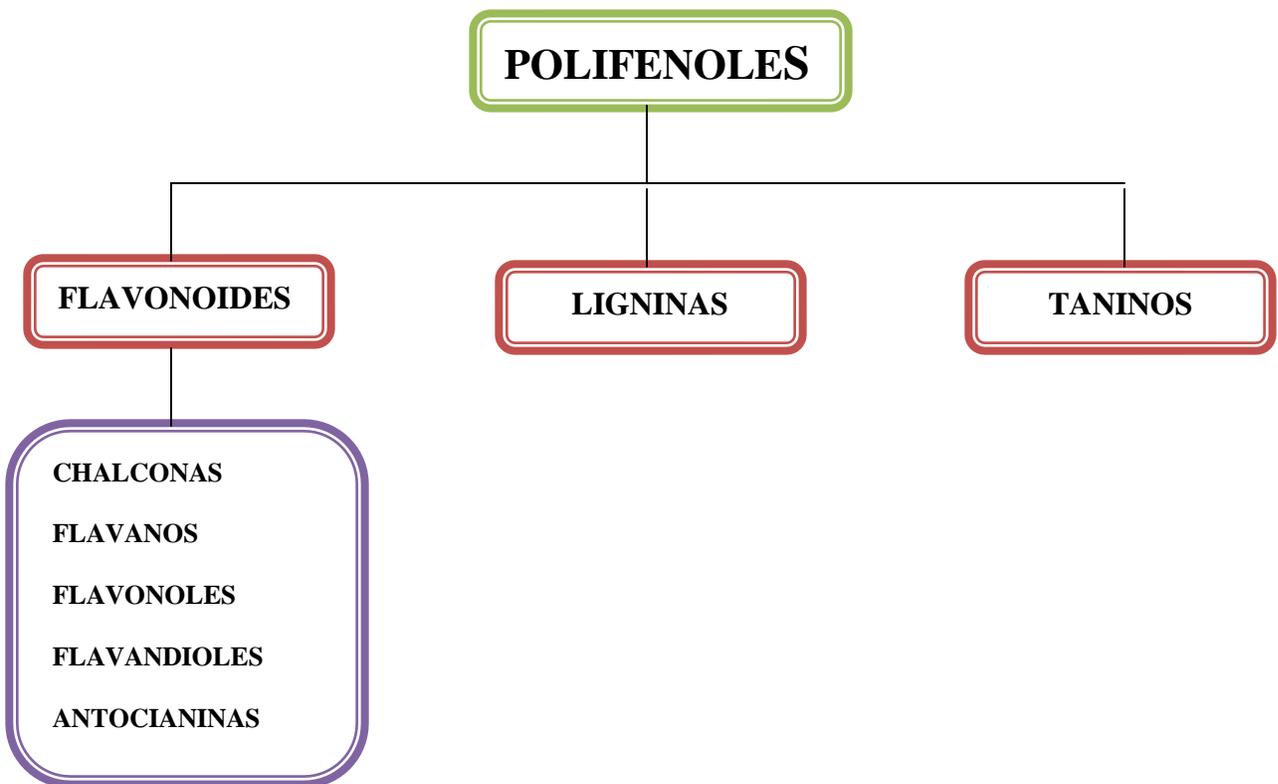
Esquema 1.

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES



Esquema 2.

CLASIFICACION DE LOS POLIFENOLES



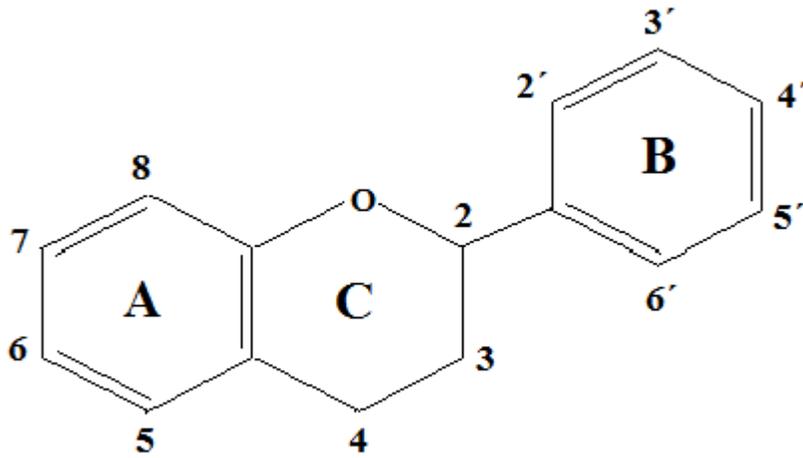


Figura 2. Estructura básica de los flavonoides, formada por un esqueleto de difenilpirano, compuestos por dos anillos de fenilos A y B, y ligados por un anillo C de pirano. Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde 2' al 6'.

CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES SEGÚN SUS GRUPOS FUNCIONALES

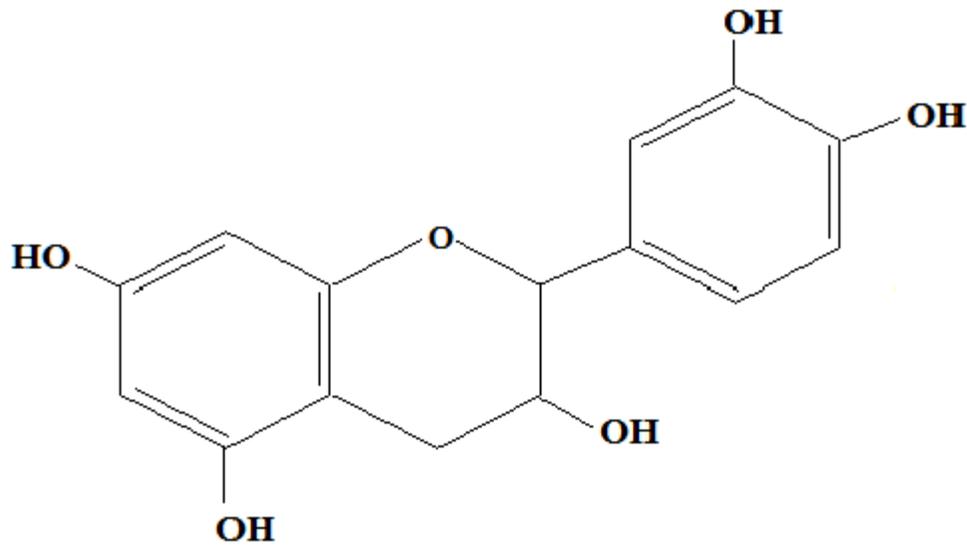


Figura 3. Representación estructural de la molécula de catequina. Presenta un grupo hidroxilo (OH) en posición 3 del anillo C.

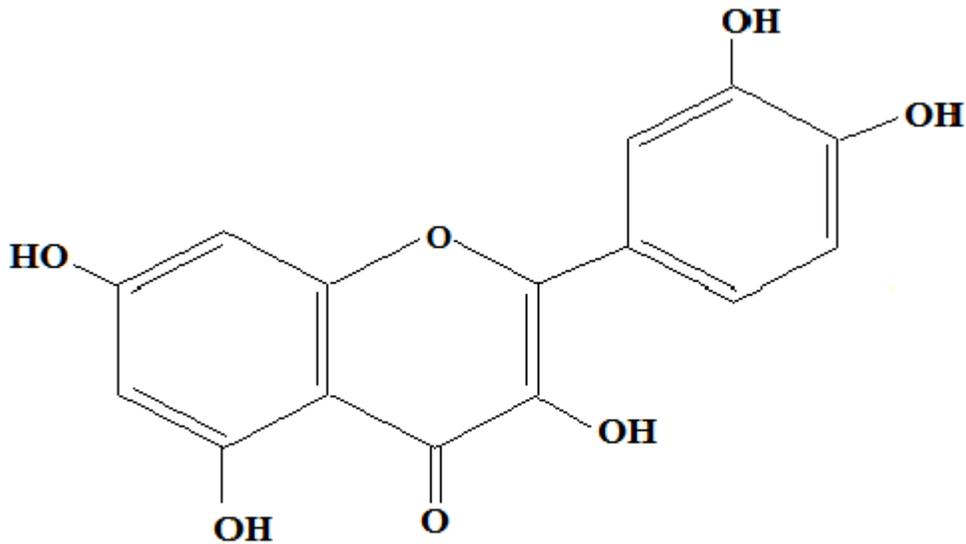


Figura 4. Representación estructural de la molécula de quercetina. Este flavonoide se considera el más activo como antioxidante, por presentar un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo OH en posición 3.

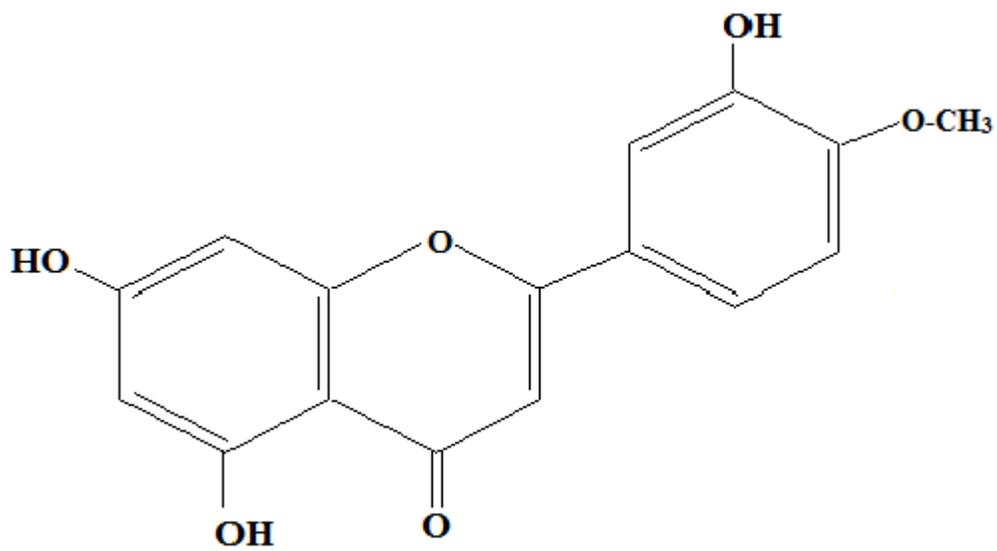


Figura 5. Representación estructural de la molécula de *diosmetina*. Posee un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carece del grupo OH libre en posición 3.

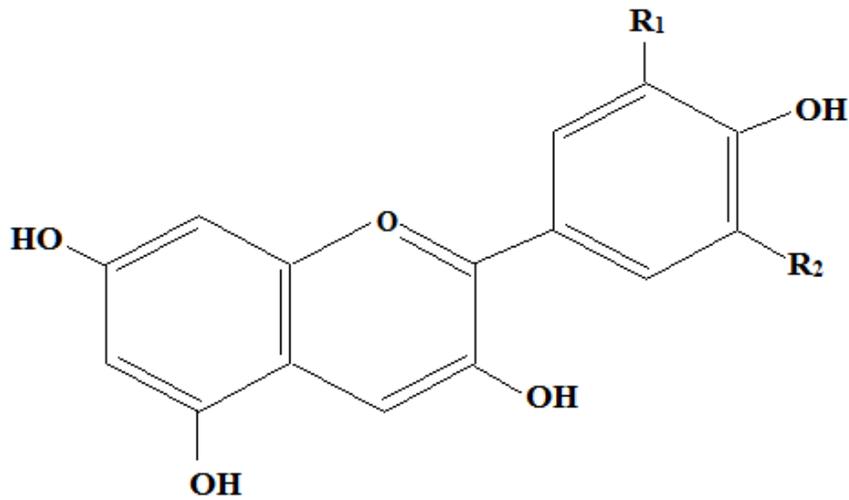


Figura 6. Representación estructural de la molécula de *antocianidina*. Presenta un grupo OH en posición 3 y posee un doble enlace entre los carbonos 2 y 4 del anillo C.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE SEGÚN LA ESTRUCTURA

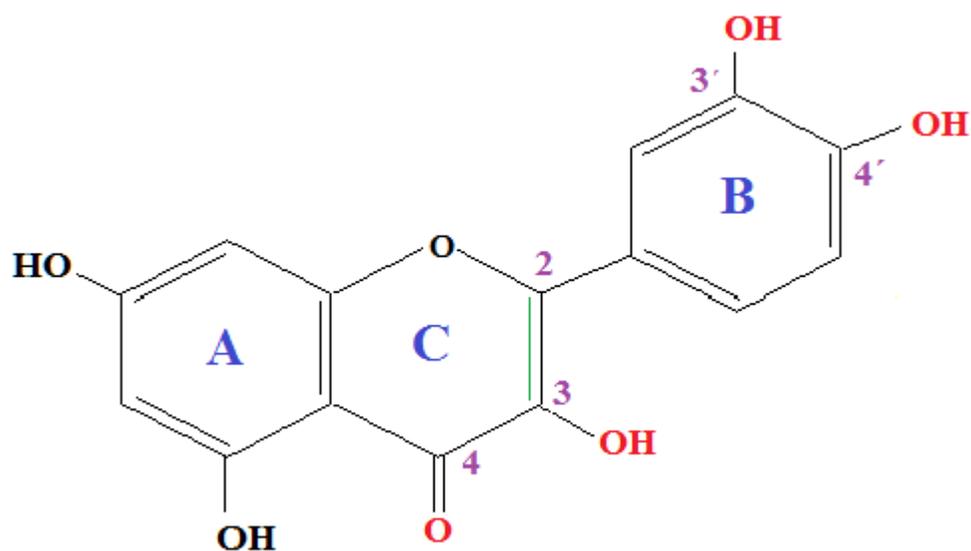


Figura 7. Esta figura presenta las posiciones estratégicas de los grupos hidroxilo libres, un doble enlace entre el carbono 2 y 3 del anillo C, y la presencia del grupo carbonilo en posición 4, características que le confieren a la molécula alta actividad antioxidante.

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU.

Extracción de polifenoles libres y solubles

Los granos de cacao fueron secados a 65⁰C por 16 horas y procesados en un molino hasta obtener partículas finas. Se tomó 10 mg de cada muestra, a las cuales se les adicionó 1.3 ml de 50% metanol. Las muestras se incubaron en el horno a 65⁰C por 30 minutos. Luego de enfriar las muestras por 5 minutos se centrifugaron a 14000 rpm. De cada muestra se extrajo el sobrenadante cuidadosamente.

Extracción de polifenoles totales

Los granos de cacao fueron secados a 65⁰C por 16 horas y procesados en un molino hasta obtener partículas finas. Se tomó 10 mg de cada muestra, a las cuales se les adicionó 1.3 ml de 1.2 M HCl. Las muestras se incubaron en baño maria a 42⁰C por 30 minutos. Luego de enfriar las muestras por 5 minutos se centrifugaron a 14000 rpm. De cada muestra se extrajo 500 µl de sobrenadante al cual se le añadió 800 µl de 50% metanol.

Cuantificación de polifenoles

La cuantificación de polifenoles fue determinada de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (F-C), usando el ácido gálico como estándar (*Yu-Tang Tung, et.al. 2007;98:1120-23*). Los extractos fueron diluidos 2 veces para los polifenoles totales y 5 veces para los polifenoles libres y solubles. A 20 µl de extracto se añadió 40 µl del reactivo de F-C junto con 940 µl de 0.4 M Na₂CO₃. Las muestras fueron incubadas en baño maría a 42⁰C por 9 min. La absorbancia de las muestras fue medida a 765 nm y los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (µg/ml AG).

MÉTODO DPPH DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La actividad antioxidante de los granos de cacao fue determinada de acuerdo al método de DPPH. Los extractos fueron diluidos 2 veces para los polifenoles totales y 5 veces para los polifenoles libres y solubles. Se tomó 50 µl de extracto y se añadió 450 µl de 50 mM de Tris-HCl junto con 900 µl del reactivo DPPH. Luego las muestras se dejaron reposar a temperatura ambiente por 30 min. La absorbancia fue medida a 517 nm. Los resultados fueron expresados como porcentaje de decoloración del radical DPPH utilizando la siguiente fórmula:

$$\%Decoloracion\ DPPH = 1 \frac{Am - Abm}{DPPH} \times 100$$

Donde Am es la absorbancia de la mezcla de reacción (DPPH + extracto), Abm la del blanco de la muestra (extracto + agua), y DPPH la absorbancia de DPPH

ANEXO 12.

Tabla 1.

CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES DE ACUERDO A RANGOS ESTABLECIDOS

Rango de concentración de polifenoles libres y solubles	Número de muestras	% Total de muestras analizadas
230-150 µg/ml	7	21%
149-70 µg/ml	16	47%
69-1 µg/ml	11	32%

Tabla 2. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES

Muestra	Código	Finca	Departamento o Región	Tipo de muestra	Concentración de polifenoles (µg/ml)
1	STE-AT-01	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	230
2	STE-AT-02	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	207.5
3	STE-AT-04	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	170
4	mTc CA 25	Santa Fe	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	170
5	mTc RA 33	Santa María	Rama, Muelle Real	Grano almacenado	162.5
6	mTc GU 34	Santa Rosa	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	160
7	mTC CA 09	Santa Eva	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	150
8	mTc NG 04	Los Cocos	Nueva Guinea, Paraisito	Grano almacenado	142.5
9	mTc RA 24	Argentina	Rama, Muelle Real	Grano almacenado	137.5
10	mTc CA 13	San Jorge	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	135
11	STE-AT-03	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	132.5
12	mTc NG 10	Mileto	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	132.5
13	mTc RA 25	San Isidro	Rama, Julio Buitrago	Grano almacenado	132.5
14	mTc CA 27	El Socorro	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	125
15	mTc MB 35	Oro Blanco	Muelle de los Bueyes, Maravillas	Grano almacenado	122.5
16	mTc CA 16	El Coyal	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	120
17	mTc MB 39	Peoresnada	Muelle de los Bueyes, Pintada I	Grano almacenado	117.5

Tabla 2. CONTINUACIÓN

Muestra	Código	Finca	Departamento o Región	Tipo de muestra	Concentración de polifenoles (µg/ml)
18	mTc GU 43	La Pachanga	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	114
19	mTc NG 03	La Lomita	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	110.1
20	mTc Gu 38	La Humildad	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	100
21	mTc CA 22B	El Aguacate	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	97.5
22	mTc NG 01	Los Laureles	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	72.5
23	mTc NG 07	Mileto	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	70
24	Muestra mercado	-	Managua	Grano almacenado	50.5
25	Cocoa, Maya	-	Managua	Cocoa en polvo	50
26	Cacao Criollo, Venezuela	-	-	Chocolate negro 75%	38.5
27	El Castillo del Cacao, Chocolate	-	Matagalpa, Matiguas	Chocolate negro 50%	32.5
28	Choco Choco, México	-	-	Cocoa en polvo	24.5
29	Johnnys , Costa Rica	-	-	Cocoa en polvo	18.5
30	Cocoa Dulce, Costa Rica	-	-	Cocoa en polvo	16.5
31	Nesquik, Nestle, Brasil	-	-	Cocoa en polvo	15.5
32	Hersheys	-	-	Chocolate con leche	10.5
33	Chocovic, Jade	-	-	Chocolate con leche	9
34	mTc MB 36	-	-	Grano almacenado	1

ANEXO 14.

Tabla 3.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES DE ACUERDO A RANGOS ESTABLECIDOS

Rango de % de polifenoles libres y solubles	Número de muestras	% Total de muestras
88-83%	8	23.5%
82-77%	7	21%
76-70%	8	23.5%
69-15%	11	32%

Tabla 4.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES

Muestra	Código	Finca	Departamento o Región	Tipo de muestra	Actividad antioxidante (%)
1	STE-AT-04	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	88.1
2	Cacao Criollo, Venezuela	-	-	Chocolate negro 75%	86.38
3	mTc CA 27	El Socorro	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	85.69
4	mTc CA 25	Santa Fe	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	85.55
5	mTc CA 09	Santa Eva	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	85.55
6	mTc GU 34	Santa Rosa	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	85.4
7	mTC CA 13	San Jorge	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	84.83
8	mTc GU 43	La Pachanga	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	83.26
9	mTc RA 33	Santa Maria	Rama, Muelle Real	Grano almacenado	80.77
10	mTc NG 04	Los Cocos	Rama, Paraisito	Grano almacenado	80.68
11	mTc NG 03	La Lomita	Nueva Guinéa, La Esperanza	Grano almacenado	80.25
12	mTc RA 25	San Isidro	Rama, Julio Buitrago	Grano almacenado	80.1
13	STE-AT-01	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	79.81
14	El Castillo del Cacao, Chocolate	-	Matagalpa, Matiguas	Chocolate negro 50%	78.61
15	Choco Choco, México	-	-	Cocoa en polvo	78.58
16	Cocoa, Maya	-	-	Cocoa en polvo	76.65
17	mTc CA 16	El Coyol	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	74.53
18	mTc NG 10	Mileto	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	72.22
19	mTc GU 38	La Humildad	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	71.67
20	mTc MB 35	Oro Blanco	Muelle de los Bueyes, Maravillas	Grano almacenado	70.89

Tabla 4.CONTINUACIÓN

Muestra	Código	Finca	Departamento o Región	Tipo de muestra	Actividad antioxidante (%)
21	Johnnys , Costa Rica	-	-	Cocoa en polvo	70.63
22	STE-AT- 02	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	70.38
23	mTc RA 24	Argentina	Rama, Muelle Real	Grano almacenado	70.1
24	mTc CA 22B	El Aguacate	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	69.38
25	Muestra Mercado	-	Managua	Grano almacenado	67.65
26	mTc MB 39	Peoresnada	Muelle de los Bueyes, Pintada I	Grano almacenado	66.75
27	Cocoa Dulce, Costa Rica	-	-	Cocoa en polvo	65.33
28	STE-AT-03	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	61.84
29	mTc NG 01	Los Laureles	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	58.22
30	Nesquik, Nestle, Brasil	-	-	Cocoa en polvo	57.44
31	Hersheys	-	-	Chocolate con leche	43.8
32	Chocovic, Jade	-	-	Chocolate con leche	38.86
33	mTc NG 07	Mileto	La Esperanza	Grano almacenado	29.9
34	mTc MB 36	-	-	Grano almacenado	14.42

ANEXO 16.

Tabla 5.

CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES DE ACUERDO A RANGOS ESTABLECIDOS

Rango de concentración de polifenoles totales	Número de muestras	% Total de muestras analizadas
60-48 µg/ml	10	29%
47-33 µg/ml	7	21%
32-0.75 µg/ml	17	50%

Tabla 6.

CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Muestra	Código	Finca	Departamento o Región	Tipo de muestra	Concentración de polifenoles (µg/ml)
1	mTc NG 04	Los Cocos	Nueva Guinea, Paraisito	Granos almacenados	60
2	mTc RA 33	Santa María	Rama, Ciudadela	Granos almacenados	57
3	mTc GU 43	La Pachanga	Rio San Juan, Los Guatusos	Granos almacenados	56
4	Cocoa, Maya	-	Managua	Cocoa en polvo	51.5
5	mTc RA 25	San Isidro	Rama, Julio Buitrago	Granos almacenados	51
6	mTc MB 39	Peoresnada	Muelle de los Bueyes, Pintada I	Granos almacenados	51
7	mTc CA 09	Santa Eva	Rio San Juan, El Castillo	Granos almacenados	49
8	mTc MB 35	Oro Blanco	Muelle de los Bueyes, Maravillas	Granos almacenados	49
9	STE-AT-01	Santo Emilio	Granada	Granos fresco	49
10	mTc RA 24	Argentina	Rama, Muelle Real	Granos almacenados	48
11	mTc GU 38	La Humildad	Rio San Juan, Los Guatusos	Granos almacenados	43
12	mTc NG 10	Mileto	Nueva Guinea, La Esperanza	Granos almacenados	42
13	mTc CA 27	El Socorro	Rio San Juan El Castillo	Granos almacenados	40
14	mTc CA 25	Santa Fe	Rio San Juan, El Castillo	Granos almacenados	39
15	mTc CA 13	San Jorge	Rio San Juan, El Castillo	Granos almacenados	38
16	mTc NG 03	La Lomita	Nueva Guinea, La Esperanza	Granos almacenados	37

Tabla 6. CONTINUACIÓN

Muestra	Código	Finca	Departamento o Región	Tipo de muestra	Concentración de polifenoles (µg/ml)
17	mTc CA 16	El Coyol	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	33
18	mTc GU 34	Santa Rosa	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	30
19	STE-AT-02	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	29
20	mTc NG 07	Mileto	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	28
21	mTc CA 22B	El Aguacate	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	26
22	STE-AT-04	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	24
23	STE-AT-03	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	19
24	Mustra Mercado		Huembes Managua	Grano almacenado	16
25	El Castillo del Cacao, Chocolate	-	Matagalpa, Matiguas	Chocolate negro 50%	15.5
26	mTc NG 01	Los Laureles	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	11
27	Choco Choco, México	-	-	Cocoa en polvo	10.7
28	Johnnys , Costa Rica	-	-	Cocoa en polvo	10.4
29	Cacao Criollo, Venezuela	-	-	Chocolate negro 75%	10
30	Cocoa Dulce, Costa Rica	-	-	Cocoa en polvo	10
31	Nesquik, Nestle, Brasil	-	-	Cocoa en polvo	9
32	Hersheys	-	-	Chocolate con leche	1
33	mTc MB 36	-	-	Grano almacenado	1
34	Chocovic, Jade	-	-	Chocolate con leche	0.75

ANEXO 18.

Tabla 7.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES TOTALES DE ACUERDO A RANGOS ESTABLECIDOS

Rango de % de polifenoles totales	Número de muestras	% Total de muestras
85-77%	8	24%
76-68%	9	26%
67-30%	17	50%

Tabla 8.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES TOTALES

Muestra	Código	Finca	Departamento o Región	Tipo de muestra	Actividad antioxidante (%)
1	mTc GU 43	La Pachanga	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	85.12
2	mTc CA 13	San Jorge	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	83.97
3	mTc CA 09	Santa Eva	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	82.68
4	mTc CA 25	Santa Fe	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	82.26
5	mTc CA 27	El Socorro	Rio San Juan El Castillo	Grano almacenado	78.96
6	El Castillo del Cacao, Chocolate	-	Matagalpa, Matiguas	Chocolate negro 50%	78.61
7	mTc GU 34	Santa Rosa	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	78.25
8	mTc NG 04	Los Cocos	Nueva Guinea, Paraisito	Grano almacenado	78.11
9	Cocoa, Maya	-	Managua	Cocoa en polvo	76.65
10	mTc GU 38	La Humildad	Rio San Juan, Los Guatusos	Grano almacenado	73.53
11	mTc NG 03	La Lomita	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	71.1
12	Johnnys , Costa Rica	-	-	Cocoa en polvo	69.36
13	mTc CA 16	El Coyol	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	69.09
14	Cacao Criollo, Venezuela	-	-	Chocolate negro 75%	68.79
15	Cocoa Dulce, Costa Rica	-	-	Cocoa en polvo	68.65

Tabla 8. CONTINUACIÓN

Muestra	Código	Finca	Departamento o Región	Tipo de muestra	Concentración de polifenoles (µg/ml)
16	Mustra Mercado	-	Mercado R. Huembes, Managua	Grano almacenado	68.65
17	mTc RA 25	San Isidro	Rama, Julio Buitrago	Grano almacenado	68.49
18	mTc CA 22B	El Aguacate	Rio San Juan, El Castillo	Grano almacenado	67.38
19	Choco Choco, México	-	-	Cocoa en polvo	67.37
20	Nesquik, Nestle, Brasil	-	-	Cocoa en polvo	66.95
21	Hersheys	-	-	Chocolate con leche	66.09
22	Chocovic, Jade	-	-	Chocolate con leche	65.81
23	mTc RA 33	Santa María	Rama, Ciudadela	Grano almacenado	63.81
24	mTc NG 01	Los Laureles	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	61.65
25	mTc NG 10	Mileto	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	58.74
26	mTc MB 39	Peoesnada	Muelle de los Bueyes, Pintada I	Grano almacenado	55.27
27	mTc MB 35	Oro Blanco	Muelle de los Bueyes, Maravillas	Grano almacenado	54.73
28	mTc RA 24	Argentina	Rama, Muelle Real	Grano almacenado	49.39
29	STE-AT-01	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	48.95
30	STE-AT-02	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	43.72
31	STE-AT-04	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	42.16
32	mTc NG 07	Mileto	Nueva Guinea, La Esperanza	Grano almacenado	38.32
33	mTc MB 36	-	-	Grano almacenado	33.51
34	STE-AT-03	Santo Emilio	Granada	Grano fresco	31.53

ANEXO 20.**Tabla 9.****PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN DEL RADICAL DPPH EN UN PERÍODO DE TIEMPO DE 30 MINUTOS.**

Muestras	Tiempo (minutos)			
	0	10	20	30
STE-AT-01	46.38%	50.28%	60.99%	63.40%
STE-AT-04	48.34%	60.84%	64.15%	66.41%
STE-AT-04	48.34%	60.84%	64.15%	66.41%
mTc RA 33	51.35%	70.33%	75.15%	77.71%
mTc GU 34	53.61%	74.39%	77.1%	77.86%
mTc GU 43	57.37%	77.86%	79.36%	79.96%
mTc CA 13	59.33%	78.91%	79.66%	80.27%
mTc CA 27	61.59%	77.25%	78.31%	83.28%
Cacao Criollo, Venezuela	65.66%	77.56%	78.16%	85.24%
mTc CA 09	66.26%	78.46%	79.06%	80.57%
mTc CA 25	70.03%	78.46%	79.51%	83.13%

ANEXO 21.**Tabla 10.****COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN TÉRMINOS DE IC₅₀**

Muestra	%Decoloración DPPH	IC ₅₀ mg/ml
STE-AT-01	46.38	0.052
STE-AT-04	48.34	0.057
mTc RA 33	51.35	0.065
mTc GU 34	53.61	0.070
mTc GU 43	57.37	0.077

Tabla 11.

VALOR MEDIO DE CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES

Departamento o Región	Numero de muestras	Valor medio $\mu\text{g/ml}$	% Total de muestra analizadas
Granada	4	185	12%
Río San Juan	9	130	27%
RAAS	11	109	32%
Productos Comerciales	10	27	29%

Gráfico 1.

VALOR MEDIO DE CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES

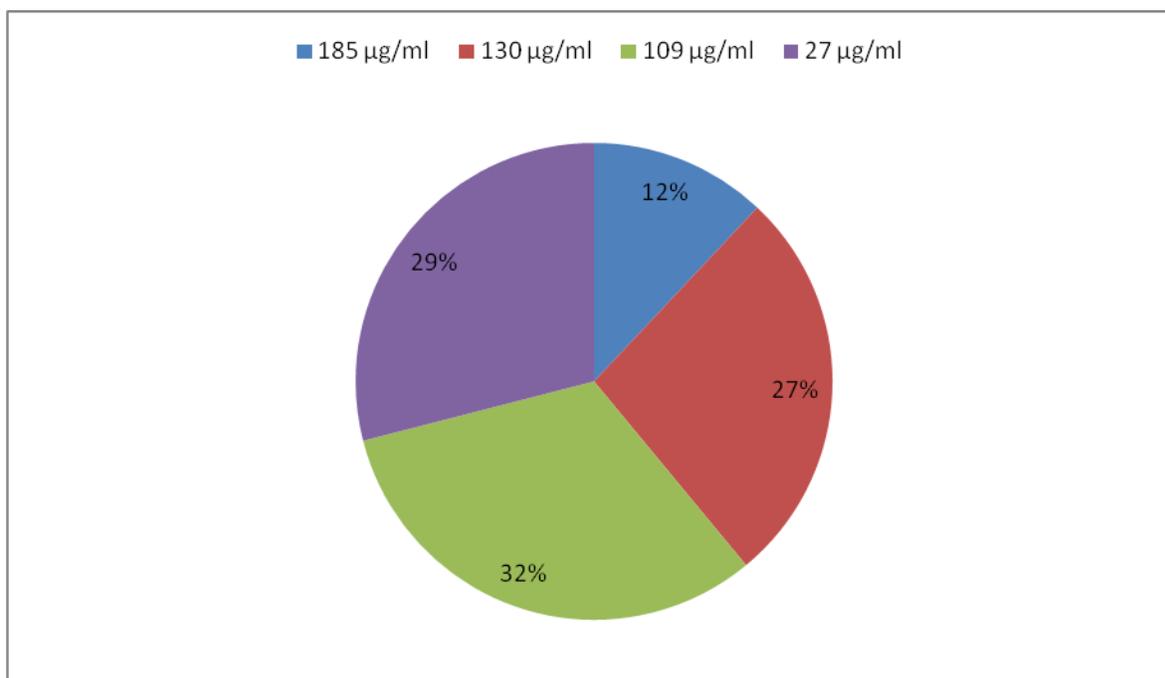


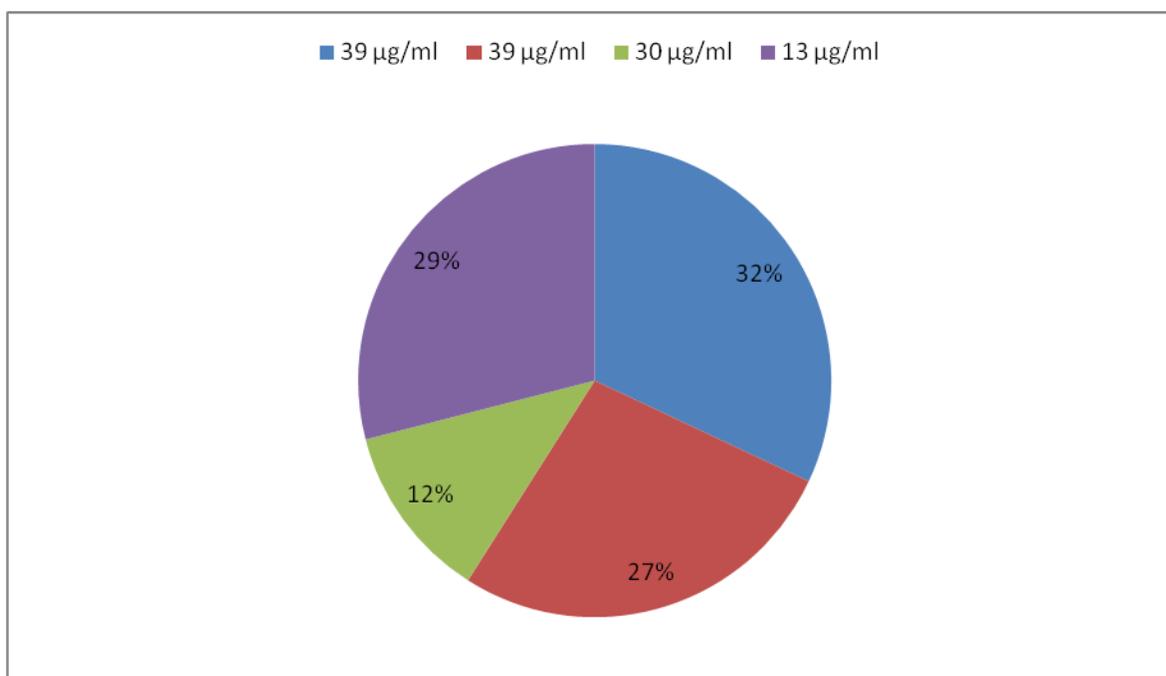
Tabla 12.

VALOR MEDIO DE CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Departamento o Región	Numero de muestras	Valor medio $\mu\text{g/ml}$	% Total de muestra analizadas
Granada	4	30	12%
Río San Juan	9	39	27%
RAAS	11	39	32%
Productos Comerciales	10	13	29%

Gráfico 2.

VALOR MEDIO DE CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES



COMPARACIÓN DE LOS VALORES MEDIOS MÁS ALTOS DE CONCENTRACIÓN ENTRE POLIFENOLES TOTALES Y POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES

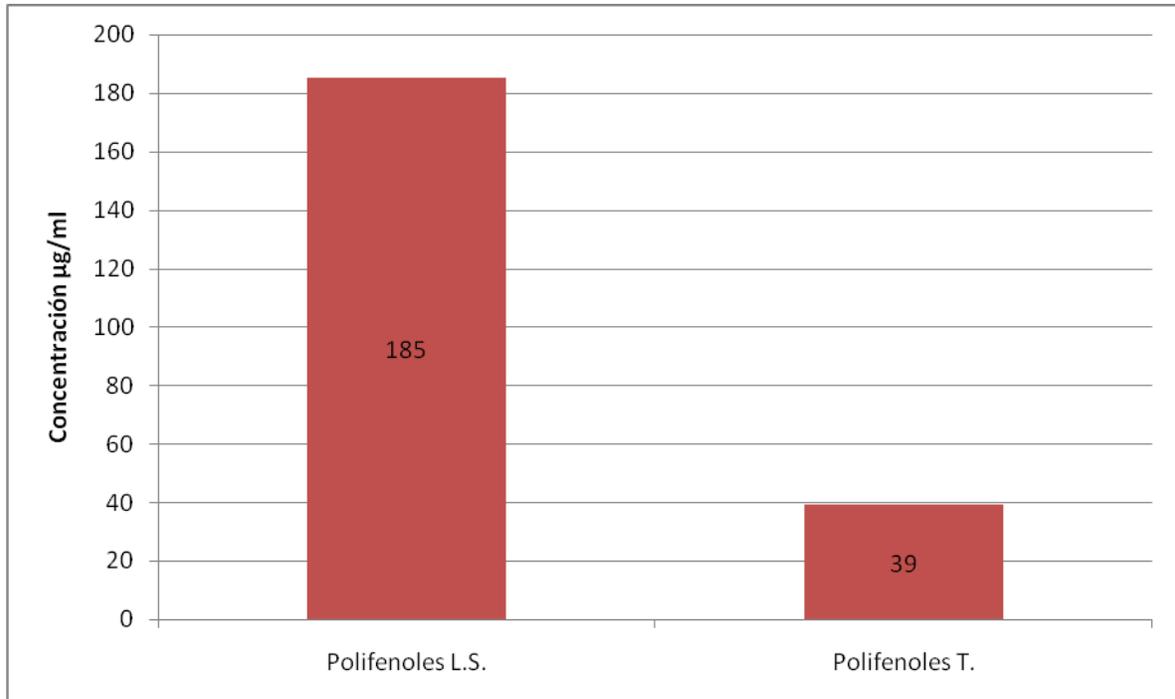


Gráfico 3. Comparación de los valores medios más altos de polifenoles libres y solubles (L.S.) y polifenoles totales (T.), expresado en µg/ml de ácido gálico. Se observa un descenso significativo lo cual sugiere que los granos de cacao presentan una mayor concentración de polifenoles L.S. en relación a los polifenoles T.

Tabla 13.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES

Rango de % de actividad antioxidante	Número de muestras	% Total de las muestras analizadas
88-65%	27	79%
64-14%	7	21%

Gráfico 4.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES

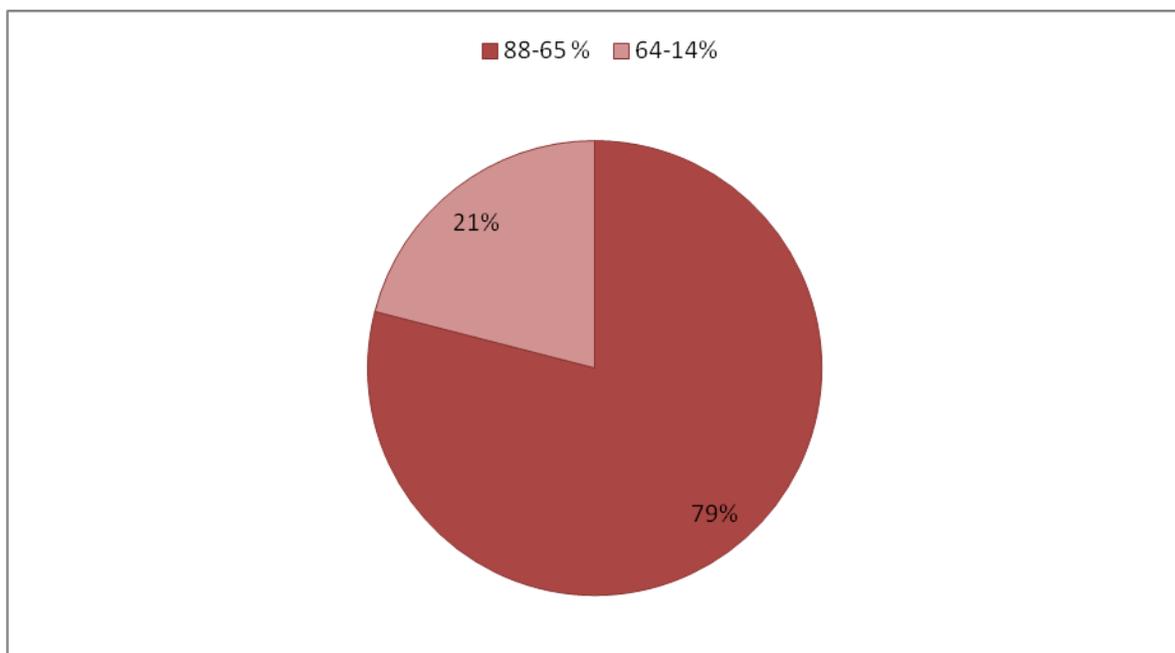


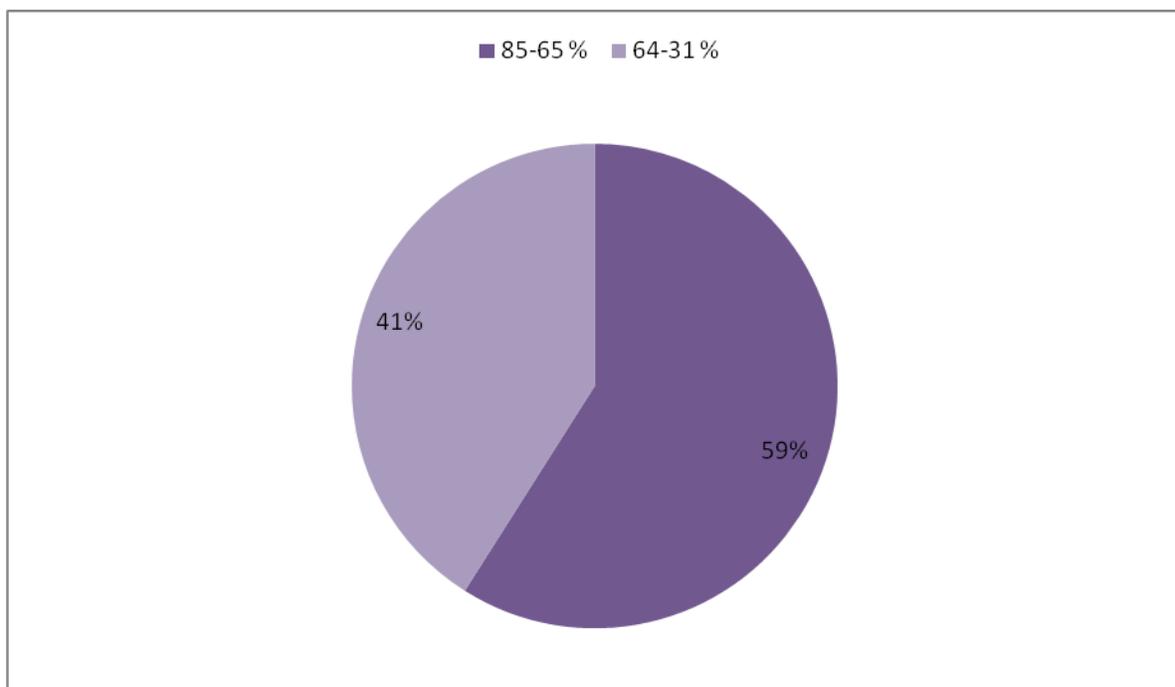
Tabla 14.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES TOTALES

Rango de % de actividad antioxidante	Número de muestras	% Total de las muestras analizadas
85-65%	20	59%
64-31%	14	41%

Gráfico 5.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE POLIFENOLES TOTALES



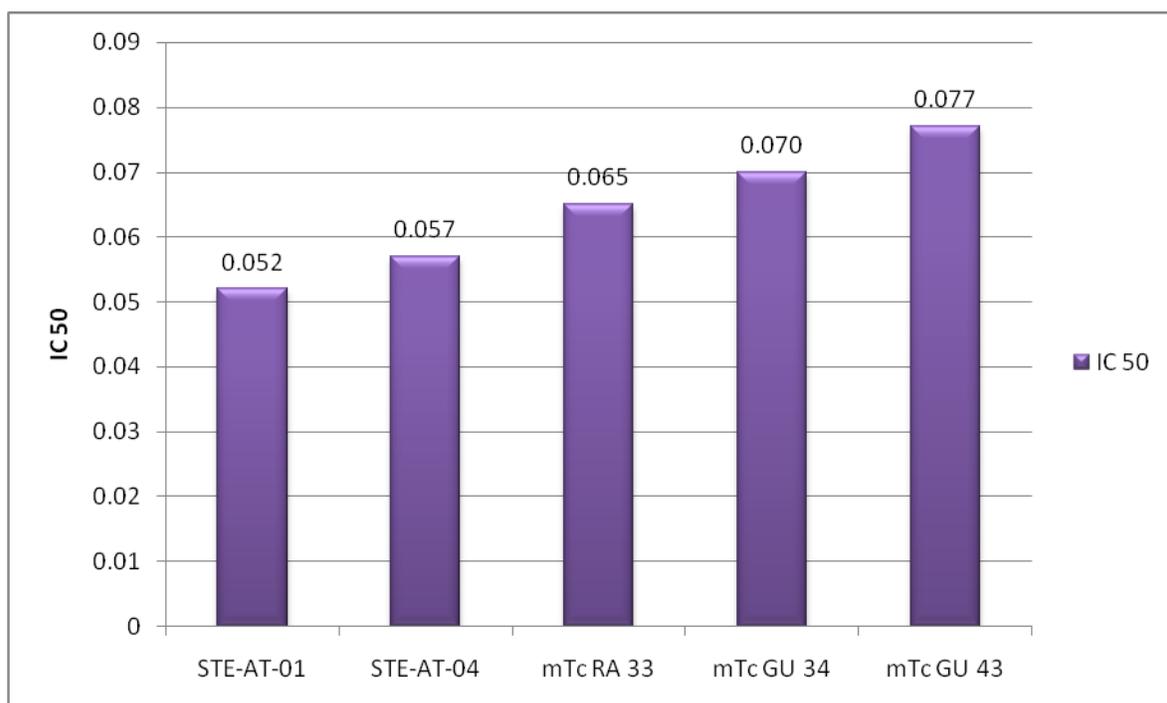
IC_{50} 

Gráfico 6. Concentración de polifenoles requerida para inhibir el radical DPPH en un 5°%.

Tabla 15.

RELACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES LIBRES Y SOLUBLES

Muestra	Código	Actividad antioxidante (%)	Código	Concentración de polifenoles (µg/ml)
1	STE-AT-04	88.1	STE-AT-01	230
2	Cacao Criollo, Venezuela	86.38	STE-AT-02	207.5
3	mTc CA 27	85.69	STE-AT-04	170
4	mTc CA 25	85.55	mTc CA 25	170
5	mTc CA 09	85.55	mTc RA 33	162.5
6	mTc GU 34	85.4	mTc GU 34	160
7	mTC CA 13	84.83	mTC CA 09	150
8	mTc GU 43	83.26	mTc NG 04	142.5



Foto 1. Muestra STE-AT-01 de la finca Santo Emilio del departamento de Granada.



Foto 2. Muestra mTc CA 25 de la finca Santa Fe del municipio de El Castillo, Rio San Juan.



Foto 3. Muestra mTc GU 34 de la finca Santa Rosa del municipio de Los Guatusos, Río San Juan.



Foto 4. Muestra mTc CA 09 de la finca Santa Eva del municipio El Castillo, Rio San Juan.