

**OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLAR ETANOL: AGUA (1:1) DE LA CÁSCARA
DE CACAO Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

OSCAR ANDRÉS CUÉLLAR GARCÍA

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2010**

**OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLAR ETANOL: AGUA (1:1) DE LA CÁSCARA
DE CACAO Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

OSCAR ANDRÉS CUÉLLAR GARCÍA

**Documento presentado como requisito parcial para optar al título de
TECNÓLOGO QUÍMICO**

**Director
Gloria Edith Guerrero Álvarez
Doctor en Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2010**

NOTA DE ACEPTACION DEL TRABAJO DE GRADO

OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLAR ETANOL: AGUA (1:1) DE LA CÁSCARA DE CACAO Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Presentado por:

OSCAR ANDRÉS CUÉLLAR GARCÍA

Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciando la sustentación oral decidimos otorgar:

La nota de: _____

Con la connotación: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy _____

Director: _____
Gloria Edith Guerrero Álvarez
Doctor en Ciencias Química

Jurado: _____
Luz Stella Ramírez Aristizábal
Doctor en Ciencias

DEDICATORIA

A Dios por darme la sabiduría para saber actuar en los momentos difíciles y por permitirme culminar con éxito mi tesis. Gracias eterno Dios por hacer posible lo que tantas veces te pedí, sin tí no hubiera logrado desarrollar mi trabajo.

A mi hijo Santiago por ser el motor mi vida, a tí todo mi triunfo.

A tí mi amor, Verónica, gracias por tu entrega y paciencia.

A mi Padre Oscar Cuéllar por enseñarme que los valores de la responsabilidad y la honestidad tienen que estar siempre presentes en cada una de las labores que ejecute en mi vida y por sembrar en mi corazón aquella frase que él dice: "LA GRATITUD ES LA MEMORIA DEL CORAZÓN"

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

A mi hermana Nathaly por comprender que no podía compartir con ella a causa de mis ocupaciones.

A mi hermano Julian David por darme el apoyo en cuanto a software y programas de diseño para realizar todas las gráficas y esquemas que necesite.

A mi abuelita rosita y al tío Arturo por su amor incondicional y por estar siempre a mi lado. Los amo con todo el corazón.

Gracias Papá y Mamá por entregar cada día de sus vidas para hacer de mí una persona íntegra que pueda ser útil a la sociedad, todo lo que soy se los debo a ustedes por completo y mis éxitos son el resultado de la conjugación de amor, valores espirituales y éticos que me enseñaron desde que tenía uso de razón.

Oscar Andrés Cuéllar García

AGRADECIMIENTOS

A Casa Luker, sede Manizales (Caldas) por permitirnos realizar una visita técnica y por la gentil donación de la cáscara de cacao que sin ella no hubiera sido posible realizar el presente estudio.

A mi directora Gloria Edith Guerrero por brindarme la oportunidad de realizar la tesis dentro de su grupo de investigación y por los consejos que recibí durante la elaboración de la misma.

Al Químico Industrial Darwin Marín Castaño por su apoyo incondicional y por dedicarme parte de su tiempo en el desarrollo de las actividades microbiológicas. Gracias por ser una gran persona, para ti mi admiración y respeto.

Al Laboratorio Clínico *López Correa* de Pereira por la generosa donación de la cepa de *Streptococcus agalactiae*, que fue aislada e identificada en dicho laboratorio.

Al Grupo Polifenoles de la UTP y en especial al profesor José Hipólito Isaza por prestarme su servicio en el equipo de HPLC y a la Química Industrial Lady Jhoana Tapias por la colaboración recibida para seleccionar un buen método de separación.

A cada uno de mis profesores por haberme dado las herramientas académicas necesarias para involucrarme en el desarrollo del presente trabajo.

A Vicky, Carlos Humberto, Javier y Germán, por proporcionarme los laboratorios, instrumentos, materiales y reactivos necesarios para concluir mi trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO	i
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Tabla de contenido	iv
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
3. ANTECEDENTES	5
4. OBJETIVOS	6
4.1. OBJETIVO GENERAL	6
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
5. MARCO TEÓRICO	7
5.1. THEOBROMA CACAO L. (CACAO): GENERALIDADES	7
5.1.2. Tipos de Cacao	7
5.1.2.1. Cacao criollo o cacao dulce	7

5.1.2.2. Forastero o cacao amargo	7
5.1.2.3. Trinitario	8
5.1.3. Clasificación Botánica	8
5.1.3.1. Fenología	8
5.1.3.2. Hojas	9
5.1.3.3. Flores	9
5.1.3.4. Fruto	9
5.1.3.5. Semillas	10
5.1.3.6. Ecología	10
5.1.4. Composición del cacao	11
5.1.4.1. Fenoles del cacao	12
5.1.4.2. Alcaloides del cacao	15
5.1.5. Cacao en Colombia	15
5.1.5.1. Distribución Geográfica y Zonas de Producción	15
5.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO DE LA CÁSCARA DE CACAO	17
5.2.1. Técnicas Cromatográficas	17
5.2.1.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	18
5.2.1.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)	18
5.2.1.2.1. Cromatografía Líquida en Fase Normal	19
5.2.1.2.2. Cromatografía Líquida en Fase Reversa	19
5.2.1.2.3. Detectores	20
5.2.1.3. Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)	20
5.2.2. Cuantificación de fenoles totales	22
5.2.2.1. Cuantificación directa a 280 nm	22
5.2.2.2. Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu ²⁴	

5.3. MÉTODO DE ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA CÁSCARA DE CACAO	24
5.3.1. Actividad antibacteriana	24
5.3.2. Descripción de bacterias	24
5.3.2.1. <i>Escherichia coli</i>	24
5.3.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
5.3.2.3. <i>Bacillus cereus</i>	25
5.3.2.4. <i>Streptococcus agalactiae</i>	25
5.3.2.5. <i>Candida albicans</i>	26
5.3.3. Método de difusión en agar	26
5.3.4. Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	28
6. SECCIÓN EXPERIMENTAL	29
6.1. MATERIAL VEGETAL	29
6.2. PRETRATAMIENTO DE LA CÁSCARA DE CACAO	29
6.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLAR ETANOL: AGUA DE LA CÁSCARA DE CACAO (<i>Theobroma cacao L.</i>)	29
6.4. EXTRACCION DE ALCALOIDES	29
6.5. EXTRACCION DE FENOLES	29
6.6. ANÁLISIS PRELIMINAR POR CROMATOGRAFÍA DE CAPA DELGADA (CCD)	31
6.6.1. Identificación de Alcaloides por CCD	31
6.6.2. Identificación de Fenoles por CCD	31
6.7. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES	31
6.7.1. Determinación directa a 280 nm	31
6.7.1.1. Curva estándar y curva de Ringbom	31

6.7.1.2. Concentración de fenoles totales por el método a 280 nm	32
6.7.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu	32
6.7.2.1. Preparación del reactivo Folin – Ciocalteu	32
6.7.2.2. Curva estándar y curva de Ringbom	32
6.7.2.3. Concentración de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteu	33
6.8. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	33
6.8.1. Cultivo de inóculo	33
6.8.2. Preparación de antibióticos estándar y muestras problema	33
6.8.3. Actividad antibacteriana	33
6.8.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	36
6.9. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICOS, EN ACETATO DE ETILO, BUTANÓLICOS Y ACUOSOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)	38
6.10. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES / ESPECTROMETRIA DE MASAS (CG/EM)	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
7.1. COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCION POR EL MÉTODO DE ULTRASONIDO (US) Y AGITACIÓN MAGNÉTICA (AG)	40
7.2. ANÁLISIS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO OBTENIDO POR ULTRASONIDO Y AGITACIÓN MAGNÉTICA (CHCl ₃ –US y CHCl ₃ –AG)	42
7.2.1. Identificación preliminar por cromatografía de capa delgada (CCD)	43
7.2.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	42
7.2.3. Análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masa (CG/EM)	45
7.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO OBTENIDO POR ULTRASONIDO Y AGITACIÓN MAGNÉTICA (AcOEt–US y AcOEt–AG)	49
7.3.1. Identificación preliminar por cromatografía de capa delgada (CCD)	49

7.3.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)	49
7.3.3. Cuantificación de fenoles totales	51
7.3.3.1. Determinación directa a 280 nm	52
7.3.3.2. Determinación de fenoles totales por el método de Folin – Ciocalteau	52
7.3.3.3. Comparación del método directo a 280 nm y Folin-Ciocalteau	53
7.4. ANÁLISIS DEL EXTRACTO BUTANÓLICO Y ACUOSO OBTENIDO POR ULTRASONIDO Y AGITACIÓN MAGNÉTICA (ButOH–US y ButOH–AG, Ac–US y Ac–AG)	55
7.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	58
7.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos clorofórmicos (CHCl ₃ -US y CHCl ₃ -AG)	65
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES	70
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	83

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Usos de los subproductos del cacao	2
Tabla 2. Composición de los granos de cacao fermentados y desecados	11
Tabla 3. Condiciones de operación del CLAE para análisis de alcaloides y fenoles	38
Tabla 4. Condiciones de operación por CG/EM para análisis de los extractos clorofórmicos	39
Tabla 5. Comparación de la eficiencia de extracción de las técnicas empleadas	40
Tabla 6. Cuantificación de alcaloides por CLAE de los extractos Clorofórmicos	45
Tabla 7. Fragmentos representativos de la cafeína encontrados en cáscara de cacao (<i>Theobroma cacao L.</i>)	48
Tabla 8. Concentración de fenoles totales de extractos en acetato de etilo frente al método a 280 nm y Folin – Ciocalteau	53

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Fruto de <i>Theobroma cacao</i> L.	8
Figura 2. Árbol del <i>Theobroma cacao</i> L.	8
Figura 3. Hojas de <i>Theobroma cacao</i> L.	9
Figura 4. Flores de <i>Theobroma Cacao</i> L	9
Figura 5. Tipos de Fruto de <i>Theobroma cacao</i> L.	9
Figura 6. Semilla de <i>Theobroma cacao</i> L.	10
Figura 7. Estructuras de la (+)-catequina y (-)-epicatequina	13
Figura 8. Estructuras de dímeros y trímeros de procianidinas en cacao	13
Figura 9. Estructura de la (-)-Catequina y la (+)-Epicatequina	13
Figura 10. Estructura de polifenoles minoritarios en cacao	14
Figura 11. Estructura de las metilxantinas presentes en el cacao: (a) Thebromina; (b) Cafeína; (c) teofilina	15
Figura 12. Distribución departamental de la producción de <i>Theobroma cacao</i> L. en Colombia	16
Figura 13. Diagrama Tecnológico de la elaboración del chocolate y sus subproductos	17
Figura 14. Esquema de un cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (CLAE)	19
Figura 15. Esquema de un sistema de cromatografía de gases / espectrometría de masas	21
Figura 16. Niveles de energía electrónicos de los orbitales moleculares	23
Figura 17. Transformación del MTT	28
FIGURA 18. Diagrama de flujo de obtención del extracto polar de la cáscara de cacao y la extracción de alcaloides y fenoles.	30
Figura 19. Método de difusión en agar	35

Figura 20. Diagrama de dilución en microplaca de 96 pozos	37
Figura 21. Porcentaje de rendimiento promedio del fraccionamiento líquido – líquido del extracto Etanol:Agua de cáscara de cacao con sus respectivos extractos: (A) Clorofórmico, (B) Acetato de etilo, (C) Butanólico, (D) Acuoso.	41
Figura 22. Diagrama Esquemático de CCD para los extractos clorofórmicos	42
Figura 23. A. Separación cromatográfica por CLAE de los estándares de alcaloides (teobromina, teofilina y cafeína) y de fenoles (ácido ferúlico).	43
Figura 23 B. Espectros ultravioleta de los estándares de teobromina (1), cafeína (2), teofilina (3).	43
Figura 24. Cromatogramas por CLAE del extracto clorofórmico de la cáscara de cacao	44
Figura 25. Cromatogramas por cromatografía de gases del extracto clorofórmico de la cáscara de cacao	46
Figura 26. Espectro de masas de la cafeína en el extracto clorofórmico de la cáscara de cacao	47
Figura 27. Diagrama Esquemático de CCD para los extractos en acetato de etilo	49
Figura 28. Espectro ultravioleta del estándar de ácido ferúlico	50
Figura 29. Estructura Fenólica	50
Figura 28. Cromatogramas por CLAE del extracto en acetato de etilo de la cáscara de cacao	51
Figura 30. Comparación de la cantidad de fenoles totales expresados como ácido ferúlico de los extractos en acetato de etilo de cáscara de cacao	53
Figura 31. Cromatogramas por CLAE del extracto butanólico de la cáscara de cacao	55
Figura 32. Cromatogramas por CLAE del extracto acuoso de la cáscara de cacao	56
Figura 33. Fenoles glicosidados en cacao	57

Figura 34. Esquema de la actividad antibacteriana de los extractos clorofórmicos y en acetato de etilo de cáscara de cacao	58
Figura 35. Inhibición CHCl ₃ -US Vs <i>B. cereus</i>	60
Figura 36. Inhibición CHCl ₃ -AG Vs <i>B. cereus</i>	60
Figura 37. Inhibición CHCl ₃ -US Vs <i>S. agalactiae</i>	60
Figura 38. Inhibición CHCl ₃ -AG Vs <i>S. agalactiae</i>	60
Figura 39. Porcentaje de inhibición frente a <i>B. cereus</i>	63
Figura 40. Porcentaje de inhibición frente a <i>S. agalactiae</i>	64
Figura 41. CMI de los extractos CHCl ₃ -US y CHCl ₃ -AG frente <i>B. cereus</i>	66
Figura 42. CMI de los extractos CHCl ₃ -US y CHCl ₃ -AG frente <i>S. agalactiae</i>	67

RESUMEN

La cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.) es el principal desecho en la agroindustria de este fruto en Colombia, ya que representa un 10% por cada tonelada de semilla seca. En el presente estudio se obtuvo un extracto polar (etanol: agua 1:1) por dos métodos: ultrasonido y agitación magnética. Se separó la fracción alcaloidal por extracción líquido – líquido con cloroformo y la fracción fenólica con acetato de etilo, el análisis preliminar se realizó por cromatografía en capa delgada (CCD). El contenido total de fenoles se determinó usando un método espectrofotométrico (Folin – Ciocalteu). Los fenoles y los alcaloides se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), utilizando teobromina, cafeína y teofilina como estándares de alcaloides y ácido ferúlico como estándar para los compuestos fenólicos. La presencia de cafeína se confirmó por cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG/EM). La actividad antibacteriana se evaluó frente a bacterias gram negativas, gram positivas y frente a un hongo: *E. coli* aislada de pollo, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *S. agalactiae* aislada en el Laboratorio López Correa de Pereira – Colombia y *Candida albicans* ATCC 10231. Los resultados mostraron que la fracciones alcaloidales CHCl₃-AG y CHCl₃-US exhibieron actividad antibacteriana con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 512 y 1024 ppm frente a *B. cereus* y 128 ppm frente *S. agalactiae* respectivamente.

“PALABRAS CLAVE” Cáscara de cacao, *Theobroma cacao* L., extracto polar, cromatografía en capa fina (CCD), contenido total de fenoles, cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria (CMI).

ABSTRACT

Cacao bean husk (*Theobroma cacao* L.) is the main remainder of cacao's agroindustry in Colombia. It means 10% by dry ton. In this study was obtained a polar extract (Ethanol: water 1:1), by two methods, ultrasound and magnetic agitation. An alkaloid fraction was separated by liquid – liquid extraction with chloroform and a phenolic fraction with ethyl acetate, the preliminary analysis was made by thin layer chromatography (TLC). Total phenol content was analyzed using a spectrophometric method (Folin – Ciocalteu). Phenolic and alkaloid compounds were obtained by High performance liquid chromatography (HPLC) using theobromine, caffeine and theophylline as alkaloid standards and ferulic acid as a phenolic standard. The presence of caffeine was confirmed by gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS). Antibacterial activity of these two fractions were evaluated in front of gram negative and gram positive bacterias and in front a fungi: *E. coli* isolated from chicken, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. cereus* ATCC 11778, *S. agalactiae* isolated by López Correa's Laboratory from Pereira – Colombia and *Candida albicans* ATCC 10231. Results showed that alkaloid fractions CHCl₃-AG and CHCl₃-US exhibited antibacterial activity against *B. cereus* with 512 y 1024 ppm and *S. agalactiae* with 128 ppm as a minimal inhibitory concentration (MIC), respectively.

“KEY WORDS” Cacao bean husk, *Theobroma cacao* L., polar extract, thin layer chromatography (TLC), total phenol content, high performance liquid chromatography (HPLC), antibacterial activity, minimal inhibitory concentration (MIC).

1. JUSTIFICACIÓN

El cacao (*Theobroma cacao L.*) es una planta que crece en una franja geográfica fundamentalmente tropical y que se extiende unos 20° de latitud hacia ambos hemisferios. Se clasifica en dos grandes grupos: el criollo y el forastero. Según La Organización Internacional del Cacao (ICCO), esta última es una variedad con gran crecimiento, debido a la mayor facilidad para su siembra y manejo. Se cultiva en arbustos de dos a tres metros que deben estar a la sombra, por lo cual normalmente se encuentran bajo árboles más grandes como el cedro, el bucare, el mango, el plátano, entre otros. Normalmente tiene entre 10 y 15 frutos, pero en algunas ocasiones puede llegar a tener 20 frutos. Se clasifica como cultivo permanente, con un ciclo de duración de casi cuarenta años. El fruto del cacao, de tamaño promedio de 20 cm de largo por 10 cm de ancho y peso aproximado de 400 a 500 g, es la base de la elaboración del chocolate, [1]. El cacao se destina para la producción de chocolate siendo el continente Africano el mayor productor con el 59% de la oferta mundial en el año 2003, liderado por Côte d' Ivoire con 1.000.000 de toneladas que representan el 34% de la producción mundial, [2].

El chocolate es una medicina antigua. El hombre ha estado cultivándolo y consumiéndolo durante más de 3000 años, [3], e incluso hoy en día sigue siendo redescubierto por sus beneficios para la salud. Ha ganado atención por sus propiedades antioxidantes que ayudarían a reducir enfermedades cardiovasculares y protegerían contra algunos tipos de cáncer, [4]. Estudios recientes revelan que un consumo moderado de chocolate amargo puede prevenir ataques al corazón. Las investigaciones se basan en diversas plantas, entre ellos el cacao, el cual produce polifenoles que reducen el nivel de oxidación del colesterol LDL y que actúan como antioxidantes para la eliminación de los radicales libres que son los responsables de obstruir las arterias, [5]. El cacao posee propiedades nutritivas, estimulantes y diuréticas, [6], así como antiasmáticas y contra dolores de cabeza, [7], además el chocolate se utiliza con fines terapéuticos, [8]. Los usos de los subproductos del cacao y su desecho, la cáscara de cacao, se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Usos de los subproductos del cacao

Subproducto Cáscara de cacao	Sector	Usos	Referencia
Manteca de cacao	Farmacéutico	Medicamentos	9,10,11,12
	Cosméticos	Elaboración de cremas, jabones, barra de labios, mascarillas.	9,10,11,12
Polvo de cacao	Alimentos	Panadería - pastelería	9,10,11,12
Cáscara de cacao	Alimentos	Elaboración de mermeladas, abono orgánico, fuente de pectinas y de proteínas, adición sobre espumas de poliuretano.	13,14,15,16,17,18.

El cacao se cultiva en Colombia principalmente para la obtención de chocolate y en el país se producen 58113 Ton / año de cacao siendo los principales productores los departamentos de Santander, Norte de Santander y Huila. En esta industria todos los elementos intermedios formados (manteca de cacao, licor de cacao, torta de cacao) son aprovechados para la elaboración de diferentes tipos de chocolate mezclando los anteriores productos en proporciones determinadas. Teniendo en cuenta el creciente número de cultivos de cacao en Colombia y la alta calidad de los granos, el 25% del cacao producido se clasifica como de sabor y fino aroma, este tipo de cacao se emplea para darle características especiales de sabor a los chocolates finos, [1]. El impacto que genera la producción de cacao en Colombia es bastante amplio debido a que se emplea para satisfacer la demanda alimentaria (confitería y chocolatería). Debido a la pertinencia nacional y regional, se está proyectando como alternativa para el reemplazo de cultivos ilícitos en el eje cafetero y concretamente forma parte de las apuestas productivas consignadas dentro de la Agenda Interna del departamento de Risaralda con el fin de incentivar el aumento en el número de cultivos para alcanzar mejores niveles de competitividad en el territorio nacional en el marco de una visión de Risaralda al 2017.

Es una de las once apuestas productivas seleccionadas como estratégica de cara a los procesos acelerados de internacionalización de las economías, [19], una muestra de ello es que en Colombia en el año 2004 se registraron exportaciones por valor de US\$ 43.7 millones, [20].

Actualmente en Colombia, la cáscara de cacao es el principal desecho de la industria productora de chocolate que representa el 10% por cada tonelada de semilla seca y constituye un grave problema para las industrias deshacerse de ella, [21]. La cáscara se emplea para la alimentación animal, [22 y 23] pero el contenido de teobromina, principal alcaloide presente en la misma, restringe la proporción en que puede ser consumida, por lo que su uso ha sido limitado, [21].

Según la revisión bibliográfica realizada no se reportan estudios en el país sobre la actividad antibacteriana de la cáscara de cacao por tal motivo se desarrolló este trabajo con el fin de explorar la actividad biológica de los extractos de cáscara de cacao particularmente en cepas autóctonas y con referencia ATCC, contribuyendo a nuevos usos potenciales de éste desecho.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Teniendo en cuenta que el principal desecho que se genera en Colombia en la industria productora de chocolate es la cáscara de cacao, se planteó el objeto de investigación del presente trabajo: ¿Será la cáscara de cacao una posible fuente de compuestos antibacteriales para utilizarlos con un potencial uso industrial?

3. ANTECEDENTES

De acuerdo con la revisión bibliográfica sólo se encontró un estudio realizado por el investigador Takashi Ooshima y sus colegas de la Universidad de Osaka en Japón, donde se evaluaron extractos acuosos de etanol al 30 y 50%, los cuales mostraron actividad cariostática puesto que generaron una significativa inhibición de la caries dental en ratas infectadas con *Streptococcus mutans*, [24].

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar el extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) con el fin de evaluar sus propiedades antibacteriales para proponer un posible uso industrial.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto polar etanol: agua (1:1) de la cáscara de cacao y determinar su rendimiento.
- Caracterizar químicamente el extracto polar obtenido.
- Evaluar la actividad antibacterial del extracto polar.
- Con base en los resultados obtenidos plantear una posible aplicación industrial de la cáscara de cacao.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. THEOBROMA CACAO L. (CACAO): GENERALIDADES

Theobroma cacao L ó comúnmente conocido como cacao pertenece a la familia *Sterculiaceae*, la cual está distribuida en toda América del Sur y América Central así como en la mayor parte del continente africano y en la parte baja del continente europeo donde se presentan climas cálidos con altitudes de 100 msnm hasta 1000 msnm, comprende cerca de 750 especies distribuidas en 50 géneros [25]. El cacao es una especie nativa del bosque húmedo tropical del noreste de América del sur, de la región amazónica, de climas cálidos principalmente. Es un árbol pequeño que crece de 3 a 6 m de altura aunque puede alcanzar alturas hasta de 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa; prefiere regiones húmedas y es una especie de interés agroindustrial, por ser base de la economía nacional en los países procesadores como Venezuela, Perú, Brasil y Colombia, [26 y 27]. El nombre en griego significa 'alimento de los dioses'; pero cacao viene del maya *Ka'kaw*. El nombre científico lleva añadida al final una abreviatura; en este caso *L.*, que es la inicial del apellido del naturalista sueco que clasificó la planta, Carlos Linneo.

5.1.2. Tipos de Cacao, [20 y 28].

5.1.2.1. Cacao criollo o cacao dulce

Este Tipo de cacao se caracteriza por tener mazorcas de coloración verde y rojiza en estado inmaduro (Ver Figura 1), tornándose amarillas y anaranjado – rojizas cuando están maduras. Se caracteriza por sus frutos de cáscara suave y semillas redondas, de color blanco a violeta, dulces y de sabor agradable. La superficie del fruto posee diez surcos longitudinales marcados, cinco de los cuales son más profundos que los que alternan con ellos. Los lomos son prominentes, verrugosos e irregulares. De este tipo de cacao se obtiene los chocolates más apetecidos en el mundo especialmente por sus sabores a nueces y frutas.

5.1.2.2. Forastero o cacao amargo

Originario de América es la raza más cultivada en las regiones cacaoteras de África y Brasil. Se caracteriza por sus frutos de cáscara dura y leñosa, de superficie relativamente tersa y de granos aplanados de color morado y sabor amargo. Dentro de esta raza destacan distintas formas como Cundeamor, Amelonado, Sambito, Calabacillo y Angoleta. El interior de las almendras es púrpura. De este tipo se obtiene un chocolate con sabor básico de cacao.

5.1.2.3. Trinitario

Se formo de manera espontánea de un cruce entre cacaos criollos y forasteros amazónicos en la isla de Trinidad (de ahí deriva su nombre). De este cruce heterogéneo se presentan diversidad de formas intermedias de mazorcas, lo mismo que la coloración, pudiéndose hallar tonos verdes y rojizos, inclusive una mezcla de ambos. El color interno del cotiledón es morado. La calidad que se obtiene de este cacao varía, pues el cultivado en Trinidad se considera fino, mientras que el cultivado en África se considera cacao corriente.

5.1.3. Clasificación Botánica, [29]:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Malvales
Familia: Sterculiaceae
Genero: *Theobroma*
Especie: *Cacao L*



Figura 1. Fruto de *Theobroma cacao L.*

5.1.3.1. Fenología

La arquitectura del árbol (Ver Figura 2), es el típico tronco erguido (crecimiento ortotrópico) al final del cual crece un verticilo de hasta 5 ramas laterales (crecimiento plageotrópico), debajo del punto de inserción de este molinete u horqueta crece otra rama dando origen a otro verticilo, pudiendo el árbol crecer hasta 20 m si se desarrolla bajo sombra intensa. Su corona es densa, redondeada y con un diámetro de 7 a 9 m. Cuando se propaga vegetativamente, por injertos o ramillas, se obtiene por lo general una planta con un tipo de crecimiento lateral o plagiotrópico, el cual puede variar en su ángulo de crecimiento, [28 y 29].



Figura 2. Árbol del *Theobroma cacao L.*

5.1.3.2. Hojas:

Como se aprecia en la Figura 3, las hojas son simples, enteras y de color verde con diversas tonalidades, posee pecíolo corto y caducan cada 2 a 3 meses, [28 y 30].



Figura 3. Hojas de *Theobroma cacao* L.

5.1.3.3. Flores:

Son pequeñas y se producen en racimos pequeños alrededor de los sitios donde antes hubo hojas (Ver figura 4). 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 ó amarillo. La polinización es entomófila destacando una mosquita del género *Forcipomya*, [28].



Figura 4. Flores de *Theobroma Cacao* L.

5.1.3.4. Fruto:

De tamaño, color y formas variables (Ver figura 5), 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, [28 y 30]. Hay dos tipos de fruto: uno es rojo y al madurar se transforman en café y el otro es verde y cuando madura se torna amarillo, [31].



Figura 5. Tipos de Fruto de *Theobroma cacao* L.

5.1.3.5. Semillas:

Como se observa en la figura 6, las semillas generalmente son muchas, están dentro de la pulpa y el color puede ser café ó pardo, [29 y 30].

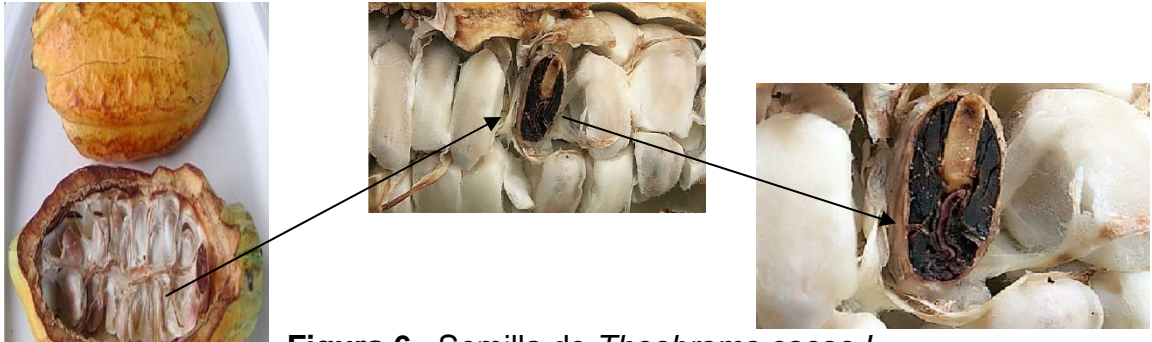


Figura 6. Semilla de *Theobroma cacao L.*

5.1.3.6. Ecología, [20].

Para el desarrollo óptimo del cultivo de cacao se requieren altitudes entre 400 a 800 m.s.n.m., con temperaturas entre los 23 a 28 °C, precipitaciones a lo largo del año de 1500 a 2500 mm y humedad relativa entre 70 a 80%. Se debe evitar variaciones excesivas de temperaturas y vientos permanentes que pueden causar el rompimiento de las ramas y la pérdida de forraje. El cacao en formación requiere de una luminosidad baja, 30% de luz y 70% de sombra. Por esta razón generalmente está asociado con cultivos de plátano, café, frutales y maderables, los cuales al mismo tiempo que le proporcionan sombra, le permiten compensar la demora en el inicio de la producción, puesto que algunos tienen un ciclo productivo más corto y se emplean como sombra temporal, mientras se desarrolla el permanente (maderables y algunos frutales). En plantaciones adultas la luminosidad puede ser mayor, 75% de luz y 25% de sombra, además no requiere de sombra en la medida en que este es producido por los mismos árboles de cacao. Los suelos requeridos para el cultivo de cacao deben tener ciertas propiedades físicas y químicas, entre ellas se tienen:

- i) La profundidad del suelo para el crecimiento de las raíces debe ser mayor de 1.5 metros.
- ii) Requiere un suelo bien drenado durante las épocas de lluvia y con buena retención de humedad en el tiempo seco, estas condiciones las tienen los suelos denominados franco arenoso, franco limoso o franco arcilloso.
- iii) La profundidad en que se encuentra el agua del suelo o nivel freático debe estar por debajo de 1.5 metros.

iv) Se desarrolla mejor en terrenos ondulados y pendientes, aunque también se puede cultivar en terrenos planos.

v) Requiere de materia orgánica que le permita retener humedad y le proporcione nutrientes al cultivo.

vi) Suelos con un pH de 5.5 a 7.5

5.1.4. Composición del cacao

La composición de los granos de cacao y de sus subproductos es muy compleja y varía dependiendo del tipo de grano, la calidad de la fermentación, secado y del posterior procesamiento del mismo (Ver tabla 2).

Semillas de Cacao

Cada semilla consta de dos cotiledones y del pequeño embrión de la planta, todos están cubiertos por la piel (comúnmente llamada cáscara). Los cotiledones almacenan el alimento para el desarrollo de la planta y dan lugar a las dos primeras hojas de la misma cuando la semilla germina. El grano de cacao consta de grasa, conocida como manteca de cacao, que conforma casi la mitad del peso seco de la semilla. La cantidad de grasa y sus propiedades tales como su punto de fusión y dureza dependen de la variedad de cacao y de las condiciones ambientales, [20 y 32].

Tabla 2. Composición de los granos de cacao fermentados y desecados, [33].

Componentes	% en peso
Agua	5.0
Grasa	54.0
Cafeína	0.2
Teobromina	1.2
Polihidroxifenoles	6.0
Proteína bruta	11.5
Mono y oligosacáridos	1.0
Almidón	6.0
Pentosas	1.5
Celulosa	9.0
Ácidos carboxílicos	1.5
Cenizas	2.6
Otras sustancias	0.5

Manteca de Cacao

La manteca de cacao contiene glicéridos trisaturados, tri-insaturados, di-insaturados y monoinsaturados. La manteca puede ser extraída del grano de diversas formas. Por ejemplo, la manteca de cacao pura es extraída a partir de la masa de cacao a través del uso de una prensa horizontal, no necesita tratamiento posterior pero a menudo es desodorizada. Los granos de cacao de calidad inferior a la estándar pueden someterse a presión sin ser descascarados usando para ello prensas continuas tipo *expeller*. Así mismo un proceso de extracción por solvente puede ser usado para extraer la manteca de la pasta residual proveniente del prensado anteriormente mencionado, en este caso, este tipo de manteca sí deberá refinarse, [32 y 34]. La manteca de cacao obtenida por presión de los granos de cacao sin cáscara presenta las siguientes propiedades:

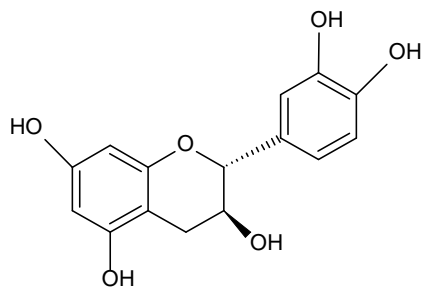
- i) Fácil fracturamiento por debajo de 20 °C.
- ii) Punto de fusión cercano a los 35 °C con suavizamiento de su textura alrededor de los 30 a 32 °C.

5.1.4.1. Fenoles del cacao

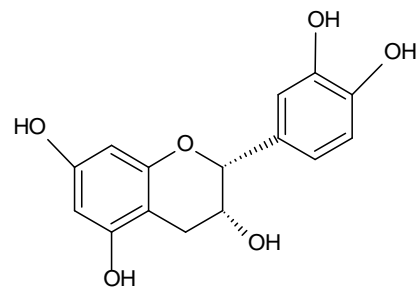
El cacao ha sido identificado como un alimento con un alto contenido de polifenoles. Los granos de cacao contiene 4 tipos de catequinas, de las cuales la (-)-epicatequina constituye el 92% del total de las mismas. El color café y morado en los granos de cacao se atribuye a los productos de una alteración compleja entre catequinas y taninos. El estudio de polifenoles en el cacao se extendió con el descubrimiento de importantes polifenoles de bajo peso molecular tales como catequina, epicatequina (Ver figura 7), dímeros como epicatequina-(4 8)-catequina (procianidina B1), epicatequina-(4 8)-epicatequina (procianidina B2) y trímeros (Ver figura 8) [epicatequina- (4 8)]₂-epicatequina (procianidina C1), [35 y 36].

Estudios previos muestran que los polifenoles monoméricos, tales como catequina y epicatequina, dímeros, trímeros y tetrámeros se separaron e identificaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa y cromatografía de gases – espectrometría de masas. La epicatequina es el componente predominante en el cacao con una proporción de 11:1 comparada con la catequina.

La (+)-catequina y (-)-epicatequina son las formas más comunes encontradas en el cacao. Sin embargo, sus respectivos enantiómeros, tales como la (-)-catequina y la (+)-epicatequina (ver figura 9) no son comúnmente encontrados en la naturaleza.

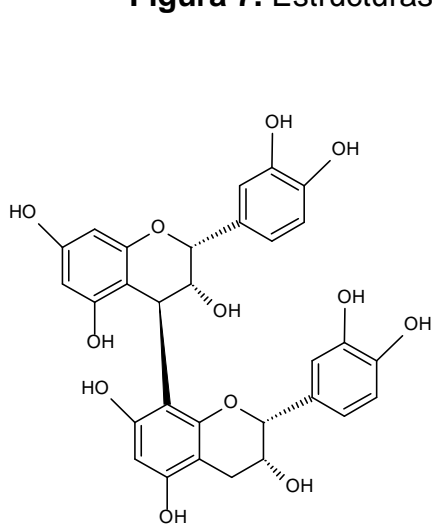


(+)-Catequina (2R, 3S)

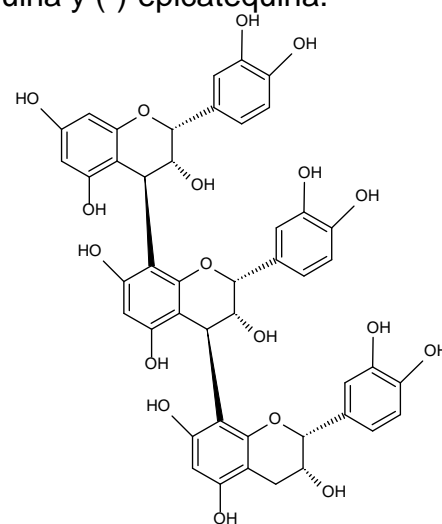


(-)-Epicatequina (2R, 3R)

Figura 7. Estructuras de la (+)-catequina y (-)-epicatequina.

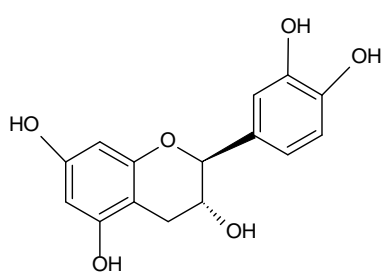


Dímero B2,
Epicatequina-(4-8)-epicatequina

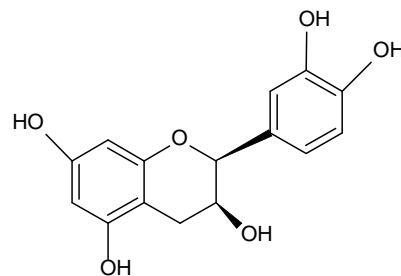


Trímero C1,
[epicatequina-(4-8)]₂-epicatequina

Figura 8. Estructuras de dímeros y trímeros de procianidinas en cacao



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



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

Figura 9. Estructura de la (-)-Catequina y la (+)-Epicatequina

Otros polifenoles en menores proporciones se han identificado en el cacao tales como quercetina, isoquercitrina (quercetina 3-O-glucósido), hiperosida (quercetina 3-O-galactosido), naringenina, luteolina, y apigenina (ver figura 10). Los flavonoides del cacao son considerados potentes antioxidantes debido a la capacidad tanto para capturar radicales libres como de formar quelatos para reducir la presencia de éstos, atributo que se da a los oligómeros presentes en éste fruto, [37]. La actividad antioxidante es mucho mayor en el cacao que en el té negro, té verde, o rojo vino. La estructura química de los flavanoles y procianidinas es importante, [38]. También se ha descrito que la catequina, epicatequina y quercetina reducen el riesgo de mortalidad por enfermedades coronarias, [39].

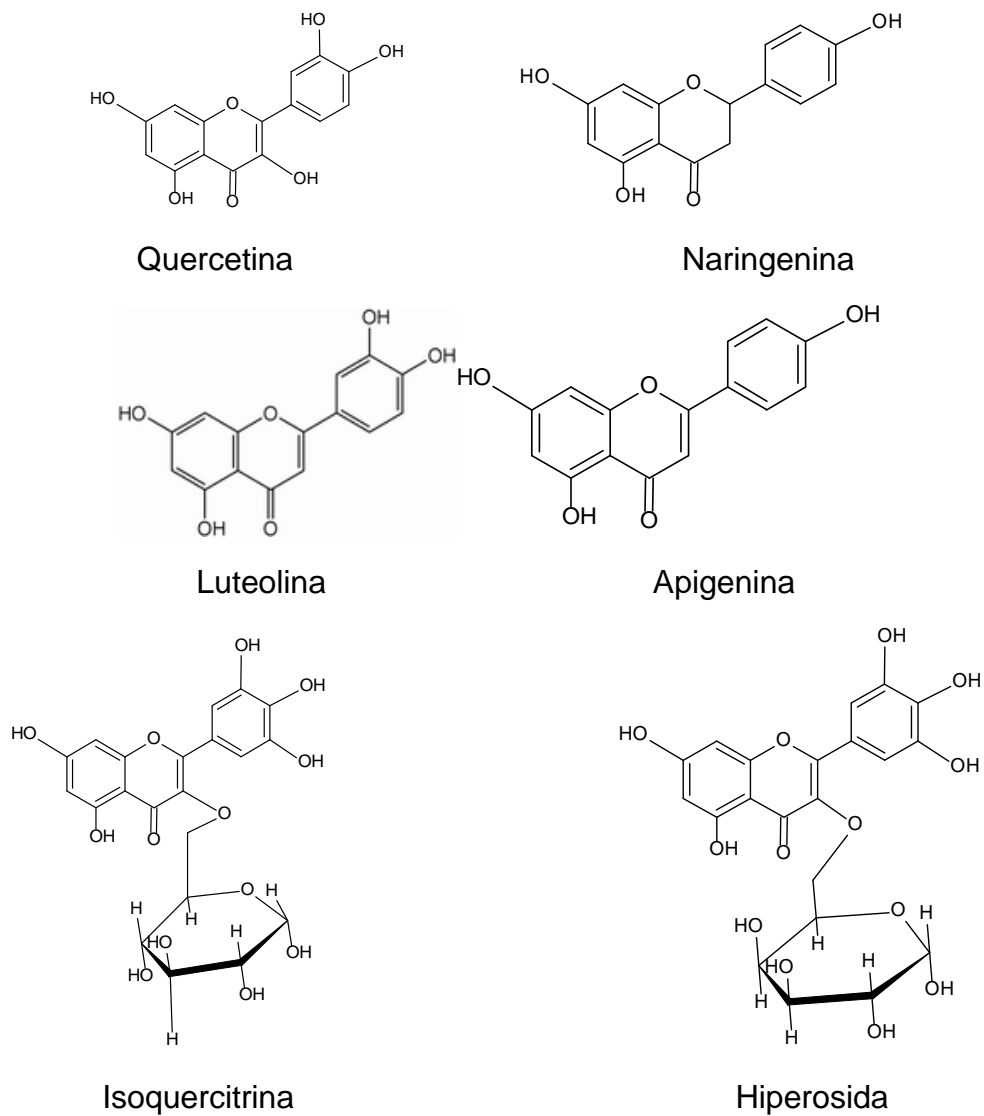


Figura 10. Estructura de polifenoles minoritarios en cacao

5.1.4.2. Alcaloides del cacao

El cacao es rico en alcaloides como thebromina, cafeína y teofilina. La thebromina es la principal metilxantina en el cacao ya que esta presente en alrededor del 4% sobre base libre de grasa, mientras que el contenido de cafeína es de aproximadamente 0,2% y la teofilina esta presente en muy bajas cantidades. Las estructuras de los alcaloides presentes en el cacao se muestran en la figura 11, [38].

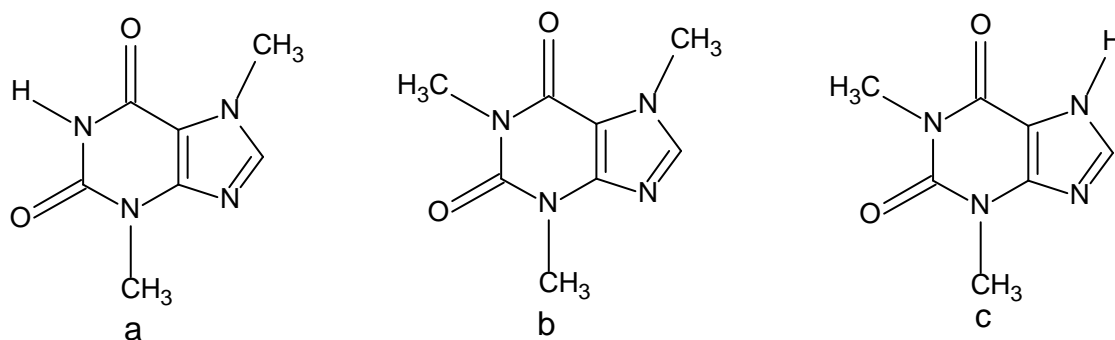


Figura 11. Estructura de las metilxantinas presentes en el cacao: (a) Thebromina; (b) Cafeina; (c) teofilina

La thebromina (3,7-dimetilxantina) es el responsable del sabor amargo de este fruto, la cafeína (1,3,7-trimetilxantina) variará en cantidad, según el tipo de grano, la especie de la planta y el grado de fermentación. Aunque está presente la teofilina (1,3-dimetilxantina), no se conoce con precisión el porcentaje de ésta en el cacao, [40 y 41].

5.1.5 Cacao en Colombia

El cacao es uno de los productos que cuentan con ventajas comparativas en Colombia derivadas de las condiciones naturales para su producción, esto es, de las características agroecológicas en términos de clima y humedad, y su carácter de sistema agroforestal conservacionista del medio ambiente. La industria chocolatera es una de las agroindustrias con más tradición en el país. Su participación en la década de los noventa fue de más del 2% en la industria de alimentos [1 y 31]. En Colombia fuera de *Theobroma cacao* L, existen 3 especies de la familia *Sterculiaceae*, donde las más conocidas según el género y la especie son *Theobroma bicolor*, *Theobroma glandiflorum* y *T. speciosum*, [42 y 43].

5.1.5.1. Distribución Geográfica y Zonas de Producción, [20 y 31].

En Colombia el cacao se cultiva en 4 zonas agroecológicas:

- i) Montaña Santandereana: abarca los departamentos de Santander y Norte de Santander.
- ii) Valles Interandinos Secos: Departamentos de Huila, sur del Tolima y norte del Magdalena.
- iii) Bosque Húmedo Tropical: zonas de Urabá, Tumaco, Catatumbo, Arauca, Meta y Magdalena Medio.
- iv) Zona Cafetera Marginal Baja: Gran Caldas, suroeste de Antioquia y norte del Tolima.

El cacao se produce, en mayor o menor escala, en casi todas las regiones (departamentos) del país. Sin embargo, como en la mayoría de los cultivos, existe una cierta concentración o regionalización de la producción. El departamento que tradicionalmente ha concentrado la mayor producción de cacao es Santander con el 46,2% de participación en el total. Le siguen en importancia con sensiblemente menor participación: Norte de Santander, Huila, Arauca, Huila, Tolima, Nariño, Antioquia y Cundinamarca, los cuales en conjunto representan el 45,4% del total.

Estos nueve departamentos participan en total, con el 91,6% de la producción, lo cual indica una alta concentración de la producción en ellos. De estos departamentos, Norte de Santander, Huila, Arauca y Antioquia muestran una tasa anual creciente de la producción durante el periodo 2000 - 2004, mientras que, departamentos como Nariño, Tolima, Cundinamarca, Meta y Cesar registran tasas decrecientes en su producción. Se puede apreciar en la figura 12, la distribución departamental de cacao, del cual hubo una producción de 30356 toneladas en el año 2004, [31]:

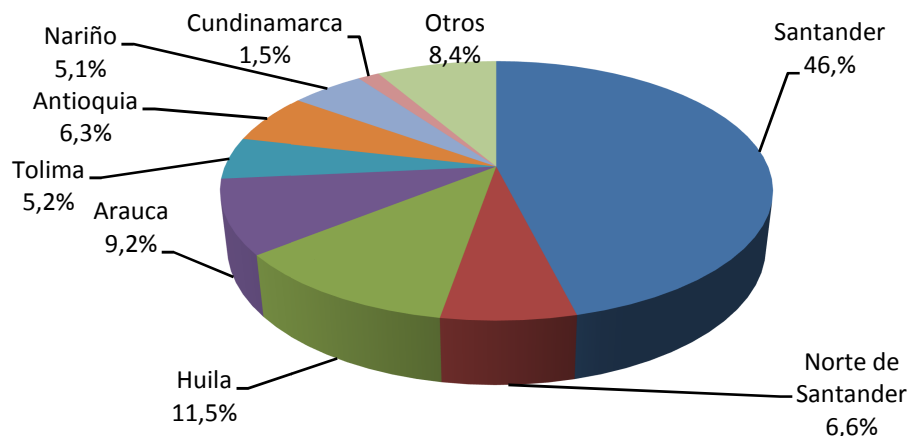


Figura 12. Distribución departamental de la producción de *Theobroma cacao L.* en Colombia

En la agroindustria del cacao, todos los componentes del cacao son utilizados para la elaboración de chocolate a excepción de la cáscara que se desecha en los diferentes países procesadores (Ver figura 13).



Figura 13. Diagrama Tecnológico de la elaboración del chocolate y sus subproductos, [44]

5.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS QUÍMICO DE LA CÁSCARA DE CACAO

5.2.1. Técnicas cromatográficas

La cromatografía agrupa un diverso conjunto de métodos que permiten separar componentes que están presentes en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios. En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible y que se fija a una columna o una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil y por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez, [45, 46 y 47].

5.2.1.1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

Esta separación se consigue mediante la diferencia entre las fuerzas de adhesión de las moléculas de los componentes a la fase móvil (normalmente, un disolvente) y a la fase estacionaria (la llamada capa fina, que puede ser silicagel).

Esta diferencia se traduce en un mayor o menor desplazamiento o movilidad de cada componente individual, lo cual permite su separación e identificación. Las separaciones se realizan por el procedimiento “ascendente”, introduciendo el borde inferior de la placa cromatográfica en el solvente, que será succionado por acción de las fuerzas capilares del recubrimiento de la superficie de la placa, [46 y 47].

Para los análisis cualitativos, la mancha en una placa de CCD se caracteriza por la distancia que recorre con relación a la distancia recorrida por la fase móvil. El parámetro usado para caracterizar esta relación es lo que se llama factor de retención o índice de retención (Ver Ecuación 1), abreviado como Rf, [46]. Para que los Rf sean reproducibles deben ser fijadas una serie de condiciones (espesor de la placa, fase móvil, fase estacionaria, cantidad de muestra). El máximo valor de Rf que se puede alcanzar es de 1, lo ideal es un Rf entre 0.65 y 0.7, [45, 48 y 49].

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}}$$

Ecuación 1. Factor de Retención

5.2.1.2. Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE)

En la cromatografía líquida (CLAE) la fase móvil es un líquido. El gran poder de la cromatografía líquida reside en la combinación de un alto intervalo de posibles propiedades de la fase móvil, junto con la elección de numerosos tipos de fases estacionarias, significativamente diferentes, así como una amplia variedad de detectores, [45 y 47].

En la CLAE el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna (Ver Figura 14). La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que pasan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil, [45 y 50].

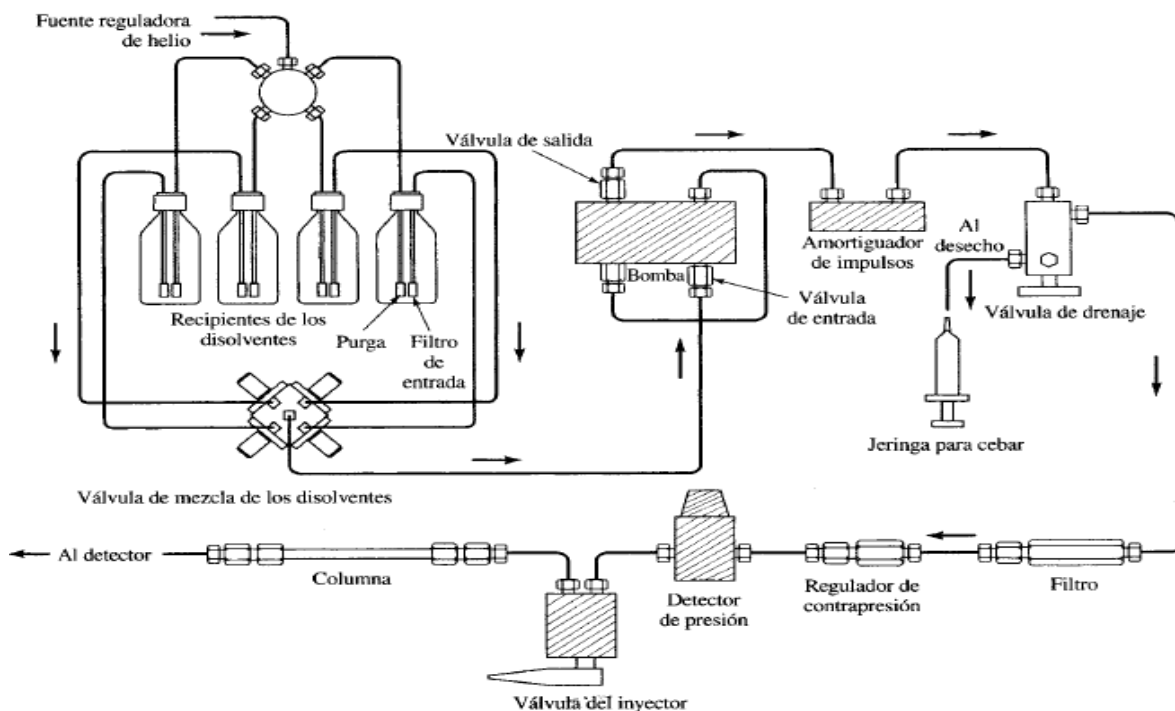


Figura 14. Esquema de un Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (CLAE)

5.2.1.2.1. Cromatografía Líquida en Fase Normal:

La fase estacionaria es más polar que la fase móvil y se utiliza cuando el compuesto de interés posee esa característica. El analito es retenido por la fase estacionaria y a medida que aumenta la polaridad de éste, se incrementa el tiempo de retención. Las fases estacionarias son normalmente polímeros inorgánicos (sílice ó alúmina), con un gran número de poros de diferente tamaño molecular, de manera que su área superficial es muy grande, [45 y 46].

5.2.1.2.2. Cromatografía Líquida en Fase Reversa:

La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases: la más común está conformada por grupos no polares unidos a la sílice ($-CH_3$, $-C_8H_{17}$, y $-C_{18}H_{37}$), de ellos, la cadena de 18 carbonos (grupo octadecilo) es la más usual. El segundo tipo de fase estacionaria empleada está compuesta de partículas esféricas de polímero orgánico. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. El tiempo de retención aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. En cromatografía en fase reversa los picos tienden a ser agudos y simétricos y el equilibrio en las reacciones adsorción/desorción es rápido, [45 y 46].

5.2.1.2.3. Detectores

Los detectores en cromatografía líquida son de dos tipos: Los detectores que se basan en alguna propiedad del eluyente tal como el índice de refracción, la constante dieléctrica, o la densidad, que se modifica por la presencia de los analitos y los detectores basados en una propiedad del soluto como la absorbancia en el UV, fluorescencia o corriente límite, que no son inherentes a la fase móvil.

Detector Ultravioleta: Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, en donde uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce la intensidad. Para comparar las intensidades de los dos haces se utilizan detectores fotoeléctricos contrastados. En cualquier caso, el cromatograma consiste en una representación del logaritmo del cociente de las dos señales detectadas en función del tiempo, [45]. Un detector de longitud de onda fija utiliza una fuente de luz que emite con intensidad luminosa máxima a una o varias longitudes de onda discretas, que se aíslan por medio de filtros apropiados. Utilizando una lámpara de mercurio de presión media, se puede seleccionar longitudes de onda de 254, 280, 313, 334 y 365 nm por medio de filtros de interferencia con paso de banda estrecho. Un detector de longitud de onda variable es un espectrofotómetro UV-Vis con paso de banda relativamente amplio, acoplado a un sistema cromatográfico. Un detector de barrido de longitud de onda utiliza dispositivos de diodos de estado sólido, los cuales trabajan en paralelo, destacando simultáneamente todas las longitudes de onda. Otros detectores empleados son el Detector de Índice de Refracción, Detector Electroquímico y Detector de fluorescencia, [51].

5.2.1.3. Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)

En esta técnica (Ver figura 15), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil conformada por un gas inerte (generalmente He), en esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de temperatura. La velocidad de migración de cada componente (y en consecuencia su tiempo de retención en la columna) será función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cada soluto presente en la muestra tiene diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos

componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente, por el detector acoplado, [45 y 52].

Los componentes una vez separados ingresan a la cámara de ionización, la ionización se consigue irradiándolos con luz ultravioleta de longitud de onda corta (fotoionización), mediante la aplicación de un campo eléctrico o con un haz de electrones el cual se produce a voltaje variable por un filamento de wolframio a una temperatura apropiada (aprox. 1800°C). Los iones producidos se recogen en un electrodo y otro electrodo con un pequeño potencial positivo, los expulsa a una cámara electrostática, donde se someten a la acción de un campo eléctrico (aprox. 3000v). El ion, acelerado en forma conveniente, entra por una ranura al analizador magnético. En este tubo curvo se mantendrá en una trayectoria central si su fuerza centrífuga está en equilibrio con la fuerza centrípeta del campo. Dado que el tubo tiene un radio fijo, si se mantiene constante el voltaje del acelerador, a cada ion o iones caracterizados por la misma relación masa/carga (m/e) corresponderá una determinada intensidad del campo magnético que los hará llegar al colector situado en el centro de la sección del tubo, en el instante en que todos los iones de determinado valor masa / carga inciden sobre el electrómetro, todos los demás se pierden por el sistema de vacío del aparato. Cada haz iónico dotado de una relación específica m/e que sale del analizador, se puede medir directamente por el método de captura o indirectamente por medio de un electrómetro. Es posible obtener espectros de masa a partir de cantidades relativamente pequeñas, lo cual posibilita el acoplamiento de un espectrómetro de masa a un cromatógrafo de gases, una de las combinaciones de aparatos más eficiente para la identificación y el estudio de sustancias difíciles de aislar en cantidad apreciable, [51].

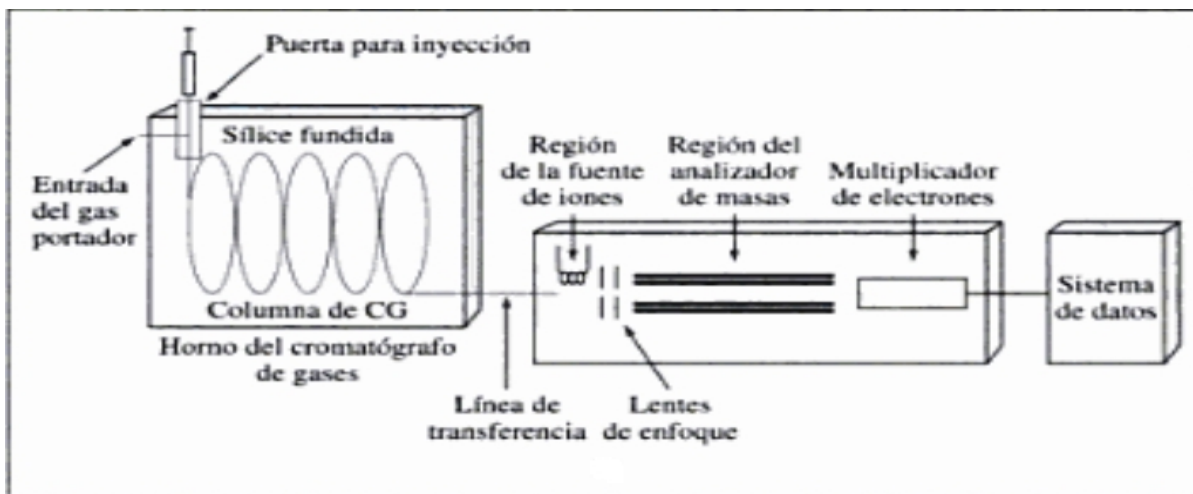
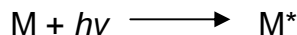


Figura 15. Esquema de un sistema de cromatografía de gases / espectrometría de masas

5.2.2. Cuantificación de fenoles totales

5.2.2.1. Cuantificación directa a 280 nm

La absorción de radiación ultravioleta o visible por una especie atómica o molecular M se puede considerar como un proceso de dos etapas, la primera de ellas consiste en una excitación electrónica como se muestra en la ecuación:



El producto de la reacción entre M y el fotón $h\nu$ es una especie excitada electrónicamente simbolizada por M^* . El tiempo de vida de la especie excitada es breve (10^{-8} a 10^{-9} s), su existencia se termina por alguno de los distintos procesos de relajación (reflexión, dispersión, absorción, fluorescencia / fosforescencia, reacción fotoquímica). La forma de relajación más común supone la conversión de la energía de excitación en calor como se observa en la siguiente ecuación:



Es importante destacar que el tiempo de vida de M^* es, generalmente tan pequeño que su concentración en cualquier momento es normalmente despreciable. La absorción de radiación ultravioleta o visible resulta, generalmente, de la excitación de los electrones de enlace, como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio. La espectroscopia de absorción molecular es, por tanto, válida para identificar grupos funcionales en una molécula. Los electrones que contribuyen a la absorción ultravioleta – visible en una molécula orgánica son:

- i) Aquellos que participan directamente en la formación del enlace entre átomos y por tanto, se asocian con más de un átomo.
- ii) Electrones no enlazantes o electrones que no participan en ningún enlace que están en gran parte localizados alrededor de átomos como oxígeno, azufre, nitrógeno y halógenos.

Las radiaciones electromagnéticas correspondientes a la región del UV-Vis aportan la energía suficiente para que tengan lugar transiciones electrónicas entre orbitales $n \rightarrow n$; $n \rightarrow n+1$; $n \rightarrow n-1$; transferencia de carga y por último de campo ligado (Ver figura 16).

Transiciones $n \rightarrow n$: Un electrón de un orbital enlazante de una molécula se excita al correspondiente orbital antienlazante, así la molécula se encuentra en el estado excitado M^* . Los máximos de absorción nunca se observan en la región ultravioleta – visible.

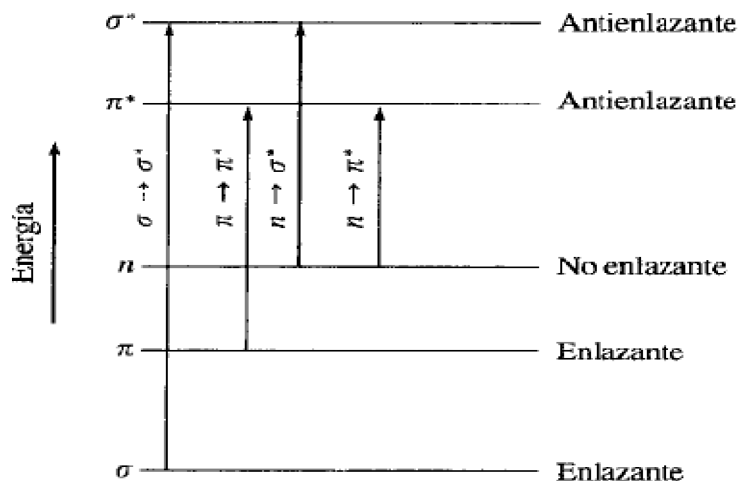


Figura 16. Niveles de energía electrónicos de los orbitales moleculares

Transiciones $n \rightarrow \pi^*$: se presentan en los compuestos orgánicos saturados que disponen de átomos con pares de electrones no compartidos (electrones no enlazantes) como -C-O, -C-S -C-N, -C-Cl. Estas transiciones se presentan en longitudes de onda comprendidas entre 150 y 250 nm, apareciendo la mayoría de los picos de absorción por debajo de 200 nm.

Transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \sigma^*$: la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ se da en compuestos orgánicos insaturados como C=C, C=O, C=C y las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \sigma^*$ se presentan en compuestos orgánicos que contengan átomos con electrones no compartidos. Las longitudes de onda a las cuales tiene lugar las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ están comprendidas entre 160 y 200 nm y entre 280 y 700 nm para las transiciones $n \rightarrow \sigma^*$.

Transiciones de transferencia de carga: se presentan en aniones inorgánicos, como ejemplos se incluyen los iones nitrato (313 nm), carbonato (217 nm), nitrito (360 y 280 nm), azida (230 nm) y tritocarbonato (500 nm). Presentan absorptividades molares muy altas, > 10.000 .

Transiciones de campo ligando: Para la serie de lantánidos y actínidos, las transiciones electrónicas se deben a los electrones de los subniveles 4f y 5f, [45 y 53].

5.2.2.2. Cuantificación de Fenoles Totales por el Método de Folin – Ciocalteau

El reactivo Folin – Ciocalteau denominado como ácido hexavalente fosfomolibdico / fosfotungstico cuya formación en solución es:

$3 \text{ H}_2\text{O} * \text{P}_2\text{O}_5 * 13 \text{ WO}_3 * 5 \text{ MoO}_3 * 10 \text{ H}_2\text{O}$, presenta el elemento Molibdeno, éste es un metal de transición que exhibe la facultad de facilitar la formación de un complejo en cualquiera de sus estados de oxidación. Se considera que hay una oxidación inicial del fenol a quinona y la reducción simultánea del molibdeno cambiando de estado de oxidación $+6$ de color amarillo a otros inferiores, luego éste en alguno o algunos de sus estados de oxidación menores, se acompleja con un ligando que puede ser agua, sodio, o carbonato formando un complejo de color azul. El complejo no se forma directamente con el fenol, por ello no existe desplazamiento batocrómico o hispocrómico apreciable con la aplicación de éste método a fenoles con diferentes sustituciones, esto es lo que hace apropiada a esta técnica para la determinación de fenoles totales, [54].

5.3. MÉTODO DE ANÁLISIS BIOLÓGICO DE LA CÁSCARA DE CACAO

5.3.1. Actividad antibacteriana

Capacidad que poseen los agentes químicos para destruir los microorganismos patógenos ó inhibir su crecimiento mediante diferentes mecanismos de acción,[55]

5.3.2. Descripción de bacterias

5.3.2.1. *Escherichia coli*

Las bacterias de los géneros *Escherichia*, *Aerobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Paracolobactrum* se incluyen en el grupo de *coliformes* ó *coli – aerogenes* y en conjunto se le denomina microorganismos y bacterias coliformes. Los coliformes comprenden todos aquellos bacilos no formadores de esporas, gram – negativas, aeróbicos ó facultativamente anaeróbicos.

Escherichia coli se considera principalmente de origen intestinal, pertenece a la familia de *Enterobacteriaceas* y se caracteriza por poseer las enzimas – Galactosidasa y – Glucoamidasa. Se desarrolla a $37^\circ\text{C} \pm 0.5$ en medios complejos, fermenta la lactosa liberando ácido y gas, fermenta los azúcares, dando ácido láctico, alcohol etílico, ácido acético, ácido succínico, dióxido de carbono e Hidrógeno. Además produce Indol a partir de Tryptófano y no produce oxidasa.

El serotipo o cepa más común es la O157:H7, causa enterohemorragias en el sistema gastrointestinal. Los síntomas principales son dolor de estómago,

diarrea que puede incluir vómito, fiebre y escalofríos. Los síntomas comienzan generalmente de dos a cuatro días después del contagio. Para su tratamiento se recomienda emplear amoxicilina, Co-Trimoxazol, cefalosporina, ampicilina y fluoroquinolones, [56].

5.3.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

P.aeruginosa es móvil y tiene forma de bastoncillo, mide aproximadamente 0.6 x 0.2 μm . Es una bacteria gram negativa y se encuentra de manera aislada, en parejas y ocasionalmente en forma de cadenas cortas. Forma colonias redondas y lisas de color verde. Posee pigmentos como piorrubina, piomelanina y piocianina. Es un microorganismo saprófito. Crece a una temperatura entre 37 °C a 42 °C, lo cual la distingue de las demás. Posee la enzima oxidasa, fermenta carbohidratos y oxida la glucosa.

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza: en el suelo, el agua, las plantas y los animales. Es un agente patógeno nosocomial, produce infección en las heridas y quemaduras, originando pus de color azul – verdoso. Genera meningitis cuando se introduce por punción lumbar e infección de las vías urinarias cuando ingresa por catéteres e instrumentos para el lavado de vías. La afección por vías respiratorias da como resultado neumonía necrosante. Se utiliza ticarcilina, mezlocilina y piperacilina combinada con amiglucósidos que por lo general son gentamicina, tobramicina o amikacina para su tratamiento, [56].

5.3.2.3. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un bacilo gram positivo, aerobio facultativo y formador de esporas, las cuales no son liberadas del esporangio. Es un microorganismo saprófito ampliamente distribuido en el ambiente siendo su hábitat natural el suelo, el agua, los vegetales, el polvo y la materia en descomposición. *B. cereus* produce dos enterotoxinas: la toxina diarreica y la toxina emética, dando lugar a dos formas clínicas distintas de intoxicación alimentaria, también genera infecciones oculares y septicemia. Se recomienda vancomicina como agente antibacterial, [56].

5.3.2.4. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae ó estreptococo – hemolítico del grupo B, es un coco gram positivo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable, no posee la enzima catalasa y oxidasa. *S. agalactiae* puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre o suero favorecen su crecimiento. Tras 18 a 24 horas de incubación en agar sangre, las colonias son de unos 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de – hemólisis.

S. agalactiae causa infecciones en gestantes y puérperas: corioamnionitis, endometritis postparto, infección de la herida quirúrgica tras cesárea e infección del tracto urinario. En adultos, las infecciones por *S. agalactiae* se presentan generalmente como formas que complican otras patologías, en particular la diabetes, las hepatopatías, el cáncer, las alteraciones neurológicas y la insuficiencia cardíaca o renal. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son las infecciones de piel y tejidos blandos. La penicilina G es el antibiótico de elección para el tratamiento de las infecciones por este microorganismo. También se utiliza amoxicilina, ampicilina, vancomicina, cefalosporinas de 1ª generación, y la combinación de penicilina con gentamicina, [56].

5.3.2.5. *Candida albicans*

Es un hongo, gram positivo, de 2 a 4 micras que produce un pseudomicelio en cultivo, en los tejidos y en los exudados. *Candida albicans* fermenta la glucosa y la maltosa produciendo ácido y gas. Genera ácido de la sacarosa y no ataca a la lactosa. En agar sabouraud incubado a temperatura ambiente, se desarrollan colonias blandas, de color cremoso que tienen olor a levadura.

Es habitante de la flora normal de las mucosas en los aparatos respiratorio, digestivo y genital femenino. Dentro de las infecciones que causa está: tromboflebitis, algodoncillo, vulvovaginitis y endocarditis. Los agentes químicos empleados para su eliminación son Ketoconazol, micostatina, anfotericina B combinada con fluconazol, [56].

5.3.3. Método de difusión en agar

Este método, es también llamado difusión por disco o Kirby-Bauer. En este caso, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos con determinadas concentraciones conocidas del antibiótico a usar. Las placas se incuban por 24 horas a 37 °C. Durante la incubación, el antibiótico se difunde radialmente desde el disco a través del agar y el microorganismo se desarrolla en toda la placa excepto alrededor de los discos cuya concentración de antibiótico es inhibitoria. El diámetro del halo de inhibición del crecimiento expresa la sensibilidad o resistencia del microorganismo. El tamaño del halo está influenciado entre otros factores por el grosor del medio de cultivo, la concentración del inóculo, la concentración del disco. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de susceptible, intermedio o resistente (S, I, ó R) de acuerdo a las tablas publicadas por National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS). La interpretación del antibiograma se lee de la siguiente forma:

Susceptible: Significa que la infección causada por ese organismo puede ser apropiadamente tratada con las dosis habituales del antibiótico estudiado.

Sensibilidad intermedia: Esta categoría incluye organismos que son inhibidos por concentraciones del antibiótico que están muy cercanas a las alcanzadas en el plasma, por lo que pueden responder pobremente a la terapia. Esta categoría, implica que ese antibiótico puede ser usado si la infección está localizada en sitios donde el fármaco es fisiológicamente concentrado (por ejemplo las quinolonas en vías urinarias), o cuando pueden ser usadas altas dosis (ejemplo penicilina).

Resistente: Significa que el organismo no sería inhibido por el antibiótico en las dosis habituales o que el organismo tiene mecanismos de resistencia contra ese determinado antibiótico.

El porcentaje de inhibición se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro Halo muestra}}{\text{Diámetro Halo Control}} \cdot 100$$

Esta técnica para ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos está recomendada por los organismos internacionales: Federation of Drugs and Foods (FDA), International Committee for Susceptibility Tests (ICS), National Committee for Clinical Laboratories Standards (NCCLS) y Center for Disease Control (CDC), [57, 58, 59, 60, 61 y 62]. Para evaluar la actividad antibacteriana se emplearon agares y caldos nutritivos que se describen a continuación:

Los agares son medios de cultivo sólidos que permiten el crecimiento de los microorganismos y en general contienen una mezcla de nutrientes como: carbono, vitaminas, minerales, iones, etc. Además poseen el pH y la humedad apropiada para que el crecimiento bacteriano ocurra, [63]. Se utilizó Agar M eller – Hinton, Agar Nutritivo y Agar Dextrosa Sabouraud.

Agar M eller – Hinton: especialmente utilizado para evaluar la actividad antibacteriana, permite el crecimiento del microorganismo seleccionado por contener menos nutrientes que el medio agar – agar, [64].

Agar Nutritivo: contiene extracto de algas del 1% ó más. Por las características de sus componentes es un medio usado para el cultivo de microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales, [65].

Agar Dextrosa Sabouraud: es utilizado para replicar el hongo *Candida albicans* a una temperatura de 37 °C. Las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas, de color y aspecto cremoso, tienen un tamaño que oscila entre 1,5 a 2 mm de diámetro. Después de 4 a 5 días se percibe un olor característico de levadura, [66].

Los caldos nutritivos son medios de cultivo líquidos que contienen productos cárnicos y proteicos (peptonas y extractos) que permiten la rápida recuperación y viabilidad del germen. Los microorganismos se evidencian por turbidez. Se empleó el caldo Infusión Cerebro Corazón, el cual está especialmente indicado para el cultivo de organismos patógenos, [67].

La composición de los agares y el caldo utilizado para la actividad antibacteriana se encuentran en el anexo 1.

5.3.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La cuantificación de la actividad *in vitro* de posibles componentes antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/mL) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. La CMI se ha establecido como "gold Standard" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana, además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado, [52].

Se preparan diluciones del agente antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado. Posteriormente se inocula dicho medio teniendo en cuenta de tapar las placas de microdilución con adhesivo para evitar la evaporación de éste y luego de la incubación se realiza la lectura, determinando la concentración que causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Tras la incubación se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazoilo (MTT), de color amarillo en solución el cual pasa a un compuesto denominado "Formazan" (Ver figura 17), de color violeta si no se inhibió el crecimiento de los microorganismos, [54, 68 y 69].

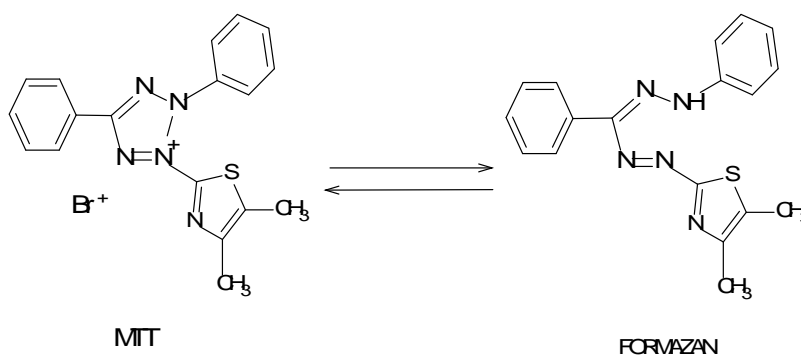


Figura 17. Transformación del MTT

6. SECCION EXPERIMENTAL

6.1. MATERIAL VEGETAL

Se empleó cáscara molida (mezcla de diferentes tipos de cacao) de granos tostados de cacao (*Theobroma cacao L.*) suministrada por La Casa LUKER, Sede Manizales, Caldas. La cáscara fue almacenada a 4 °C en el Laboratorio de Oleoquímica de la Universidad Tecnológica de Pereira para posteriores análisis.

6.2. PRETRATAMIENTO DE LA CÁSCARA DE CACAO

La cáscara molida de cacao fue desengrasada siguiendo la metodología propuesta por varios autores, [70 y 71], empleando hexano como solvente en una relación muestra / solvente 1:10 y realizando la extracción 3 horas.

6.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POLAR ETANOL: AGUA (1:1) DE LA CÁSCARA DE CACAO (*Theobroma cacao L.*)

La extracción se llevó a cabo por dos métodos: Extracción por ultrasonido (EXTUS) y Extracción por agitación magnética (EXTAG) con base en la metodología propuesta por varios autores, [72, 73 y 74]. Para ambos casos se partió de 20 g de cáscara de cacao molida y una mezcla de 100 ml de etanol absoluto: agua (1:1) como solvente, [75 y 76], para una relación muestra / solvente 1:5 y un tiempo de extracción de 2 horas. Los extractos crudos se filtraron al vacío a través de papel filtro Whatman No. 4, los filtrados se conservaron protegidos de la luz y a 4 °C para las posteriores extracciones (Ver figura 18).

6.4. EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES

Los extractos etanólicos crudos obtenidos (EXTUS Y EXTAG) según numeral 6.3, se extrajeron 8 veces con cloroformo (1:1) en embudo de separación, la fase orgánica se concentró en rotaevaporador hasta eliminar la mayor parte del solvente, se terminó de evaporar por corriente de nitrógeno y se conservó para su posterior análisis, obteniendo los extractos CHCl_3 -US y CHCl_3 -AG, [77].

6.5. EXTRACCIÓN DE FENOLES

Secuencialmente se realizaron extracciones líquido – líquido por triplicado a la fase acuosa del proceso anterior adicionando acetato de etilo en proporción (1:1) y finalmente n-butanol saturado (1:1), cada uno de los extractos se filtraron al vacío, se concentraron por rotaevaporación y se terminó de eliminar el solvente por corriente de nitrógeno, [77]. Se obtuvo 3 extractos correspondientes a los solventes utilizados en la separación líquido – líquido, los cuales fueron AcOEt-US y AcOEt-AG, ButOH-US y ButOH-AG, Ac-US y Ac-AG.

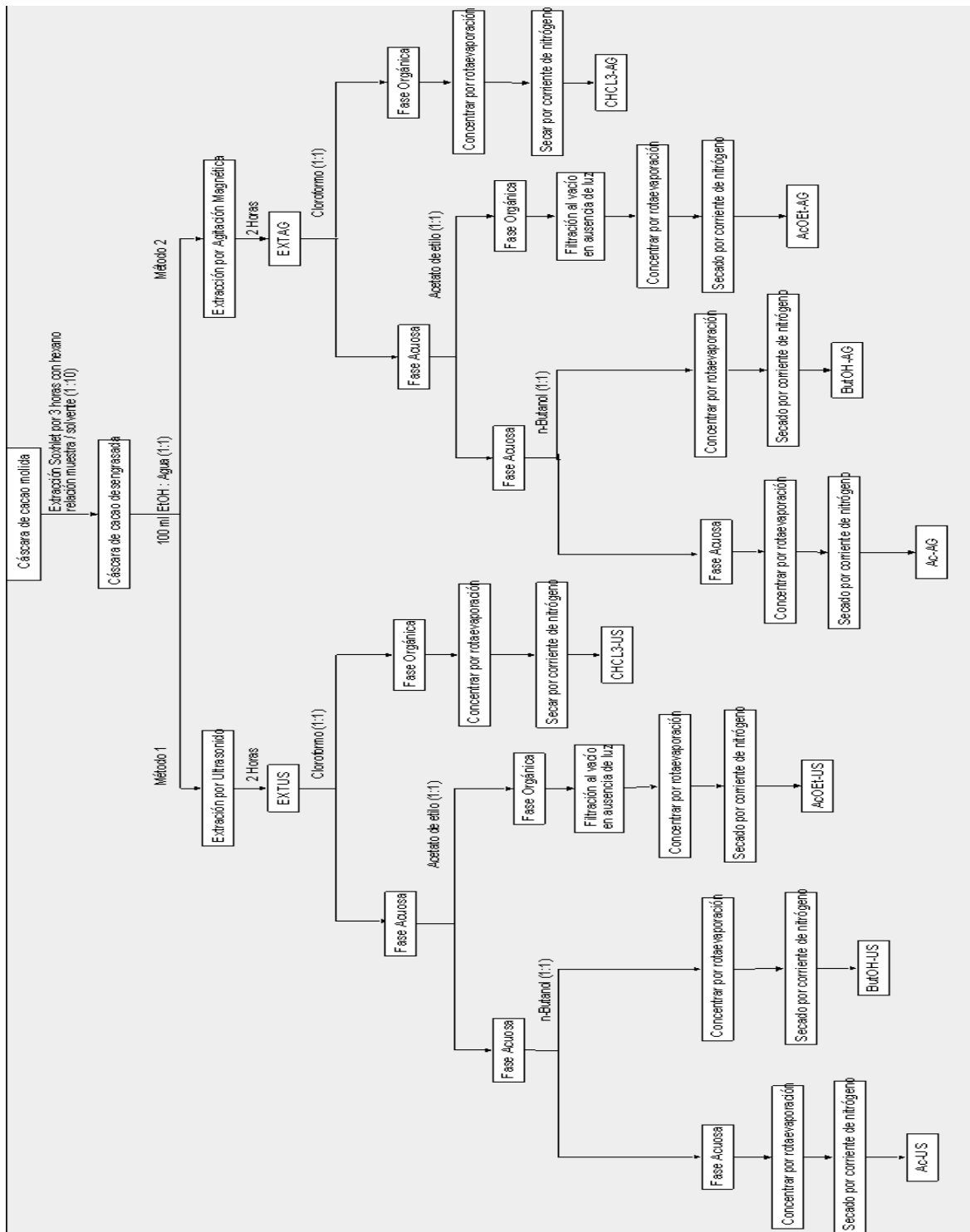


FIGURA 18. Diagrama de flujo de obtención del extracto polar de la cáscara de cacao y la extracción de alcaloides y fenoles.

6.6. ANÁLISIS PRELIMINAR POR CROMATOGRAFIA DE CAPA DELGADA (CCD)

Cada extracto fue almacenado en recipientes de vidrio debidamente rotulados, guardando una muestra de 2 ml en cada caso para realizar análisis posteriores por cromatografía de capa delgada.

6.6.1. Identificación de Alcaloides por CCD

Se realizó cromatografía de capa delgada (CCD) utilizando como fase estacionaria placas de sílica gel 60 F₂₅₄, estándares de teobromina, cafeína y teofilina y como fase móvil cloroformo:metanol en proporción (9:1), revelando las manchas con luz ultravioleta a onda corta y onda larga para los extractos CHCl₃-US y CHCl₃-AG, [78].

6.6.2. Identificación de Fenoles por CCD

Se emplearon placas de sílica gel 60 F₂₅₄, y como fase móvil cloroformo:metanol:agua en proporción (7:13:8). Los extractos AcOEt-US y AcOEt-AG se corrieron junto con un estándar de ácido ferúlico. Las placas se revelaron con luz ultravioleta a onda corta y onda larga, según estudios previos, [77].

6.7. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES, [54 y 79].

La concentración de fenoles totales expresada como equivalentes de ácido ferúlico se midió por triplicado por dos técnicas espectrofotométricas para los extractos AcOEt-US y AcOEt-AG.

6.7.1. Determinación directa a 280 nm

6.7.1.1. Curva estándar y curva de Ringbom

Solución Estándar de Ácido Ferúlico:

Solución A: Se preparó 100 ml de solución de 250 ppm de ácido ferúlico en agua.

Solución B: A partir la solución A se preparó 100 ml de solución de 50 ppm. La curva estándar se realizó a temperatura ambiente con un rango de concentración de 1 a 30 ppm fijando un rango de linealidad y por medio de la curva Ringbom se determinó el rango óptimo de trabajo.

6.7.1.2. Concentración de Fenoles Totales por el método a 280 nm

A cada extracto (AcOEt-US y AcOEt-AG) se le realizó la dilución respectiva para posteriormente medir la absorbancia a una longitud de onda de 280 nm en un Espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec Shimadzu, utilizando celdas de cuarzo y como blanco agua. Para cada patrón y cada extracto la lectura de la absorbancia se hizo por triplicado de forma independiente.

6.7.2. Determinación de Fenoles Totales por el método de Folin – Ciocalteau

Se cuantificaron los fenoles totales de los extractos AcOEt-US y AcOEt-AG obtenidos de la cáscara de cacao.

6.7.2.1. Preparación del reactivo Folin – Ciocalteau

Se disolvió 10 g de tugstato de sodio y 2,5 de molibdato de sodio en 7 ml de agua, se agregaron 5 ml de ácido fosfórico y 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. Lo anterior fue dejado en reflujo por 8 horas. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó 16 g de sulfato de litio y 1 gota de bromo, dejando para reflujo 15 minutos. Finalmente se aforó a 100 ml con agua destilada y se conservó en frasco ámbar a temperatura ambiente. Finalmente se prepararon dos soluciones utilizadas para realizar la curva estándar:

Solución 1: Solución de Folin – Ciocalteau: agua en proporción (1:1) disolviendo 10 ml del reactivo Folin – Ciocalteau en 10 ml de agua destilada.

Solución 2: Se preparó 100 ml de solución de carbonato de sodio al 20%.

6.7.2.2. Curva estándar y curva de Ringbom

Solución Estándar de Ácido Ferúlico:

Solución A: Se preparó 100 ml de solución de 250 ppm de ácido ferúlico adicionando simultáneamente 2 gotas de ácido fosfórico para su estabilización.

Solución B: A partir la solución A se preparó 100 ml de solución de 50 ppm. La curva estándar se realizó a temperatura ambiente con un rango de concentración de 2 a 18 ppm fijando un rango de linealidad y por medio de la curva Ringbom se determinó el rango óptimo de trabajo.

6.7.2.3. Concentración de Fenoles Totales por el método de Folin – Ciocalteau

Cada extracto (AcOEt-US y AcOEt-AG) se diluyó según límites de absorbancia de la curva de calibración y se adicionó: 0.8 ml de solución 1 + 0.2 ml de solución 2, se aforó a 10 ml con agua destilada y se incrementó la temperatura a 60 °C por 1 hora y media.

La lectura se hizo en un Espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec Shimadzu a una longitud de onda de 820 nm, empleando celdas de cuarzo y como blanco los componentes mencionados en el párrafo anterior. Para cada patrón y cada extracto la lectura de la absorbancia se hizo por triplicado de forma independiente.

6.8. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

6.8.1. Cultivo de inóculo

La cepa bacteriana de *Escherichia coli* aislada de pollo resistente a amoxicilina fue donada por la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Caldas (Manizales / Colombia), en donde fue aislada e identificada.

La cepa de *Streptococcus agalactiae* aislada de un paciente del Laboratorio Clínico López Correa de Pereira (Risaralda / Colombia), fue identificada y donada para el presente estudio.

Se utilizó una cepa de *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Candida albicans* ATCC 10231.

6.8.2. Preparación de antibióticos estándar y muestras problema

Se utilizó como blanco dimetilsulfóxido (DMSO) al 99% y como control de inhibición se empleó Ampicilina (25 mg/ml) para *Pseudomonas aeruginosa*; Amoxicilina (5 mg/ml) para *Bacillus cereus* y *Streptococcus agalactiae*; Ciprofloxacina (0.125 mg/ml) para *Escherichia coli* aislada de pollo y Micostatina (5 mg/ml) para *Candida albicans*.

Los extractos EXTUS, EXTAG, CHCl₃-US, CHCl₃-AG, AcOEt-US y AcOEt-AG se solubilizaron en DMSO al 99% (Ultrasonido Fisher Scientific FS60H, Laboratorio de Oleoquímica. UTP) a las concentraciones de 100, 50 y 25 mg/ml.

6.8.3. Actividad antibacteriana

El bioensayo se realizó por el método de difusión en agar, una modificación del método desarrollado por Kirby-Bauer. Cada bacteria fue replicada en dos tubos de ensayo de 10 ml con el medio líquido infusión–cerebro–corazón (BHI) y caldo sauboraud para *C. albicans*. Por medio de un asa se tomó una muestra de la bacteria u hongo según el caso y junto a un mechero Bunsen se depositó en

cada tubo, el cual se agitó e incubó por 24 horas a 37 °C. Posteriormente se midió la absorbancia de las bacterias a 540 nm y la del hongo a 490 nm (Espectrofotómetro Génesis 10. Laboratorio de Análisis Instrumental. UTP), usando como blanco el medio líquido respectivo. Finalmente la absorbancia se ajustó a 0.1, que corresponde a 0.5 en la escala McFarland con una concentración de 10^4 UFC / mL.

Posteriormente La siembra se llevó a cabo en medio sólido utilizando la técnica modificada de Kirby-Bauer. Se adicionó 100 μ L de la bacteria previamente ajustada su concentración (en el caso del hongo, se adicionaron perlas de ebullición, se agitó constantemente hasta obtener una distribución homogénea en toda la caja y se retiraron las perlas) a una caja de petri preliminarmente esterilizada, añadiendo seguidamente 25 mL de Agar Müeller – Hinton con una concentración de 34 g/L a 50 °C. Se homogenizó 30 veces en forma circular y 30 veces en forma de ocho. El medio se dejó enfriar a temperatura ambiente y después de que se solidificó, con la ayuda de una pipeta pasteur esterilizada se perforó el medio y se hicieron 5 pozos equidistantes los cuales se sellaron en el fondo con 20 μ L del mismo agar.

En el pozo central se adicionó 10 μ L de DMSO al 99% (como blanco), a los cuatro pozos restantes en su orden de izquierda a derecha se adicionó en cada caso 10 μ L del antibiótico sugerido en el numeral 6.8.2 y los extractos a evaluar a las concentraciones de 100, 50 y 25 mg/ml. Finalmente cada caja se llevó por 24 horas a la incubadora (Incubadora WTC Binder. Laboratorio de Microbiología. UTP) a una temperatura de 37°C.

Se procedió a evaluar la actividad antibacterial: se midió el diámetro del halo de inhibición del extracto objeto de estudio con respecto al del control. Cada halo se midió en milímetros con ayuda de una regla de inhibición de cefobid de cefaperazona. Se tomaron tres medidas (ancho, largo y diagonal) para permitir un control estadístico del factor inhibitorio, [59, 80 y 81].

Todo el procedimiento se realizó por triplicado y tanto el material de vidrio, agares y caldos fueron previamente esterilizados (Autoclave All American Electric Pressure Steam Sterillizer. Modelo No. 25X. Laboratorio de Microbiología. UTP). La figura 19 esquematiza el procedimiento anterior.

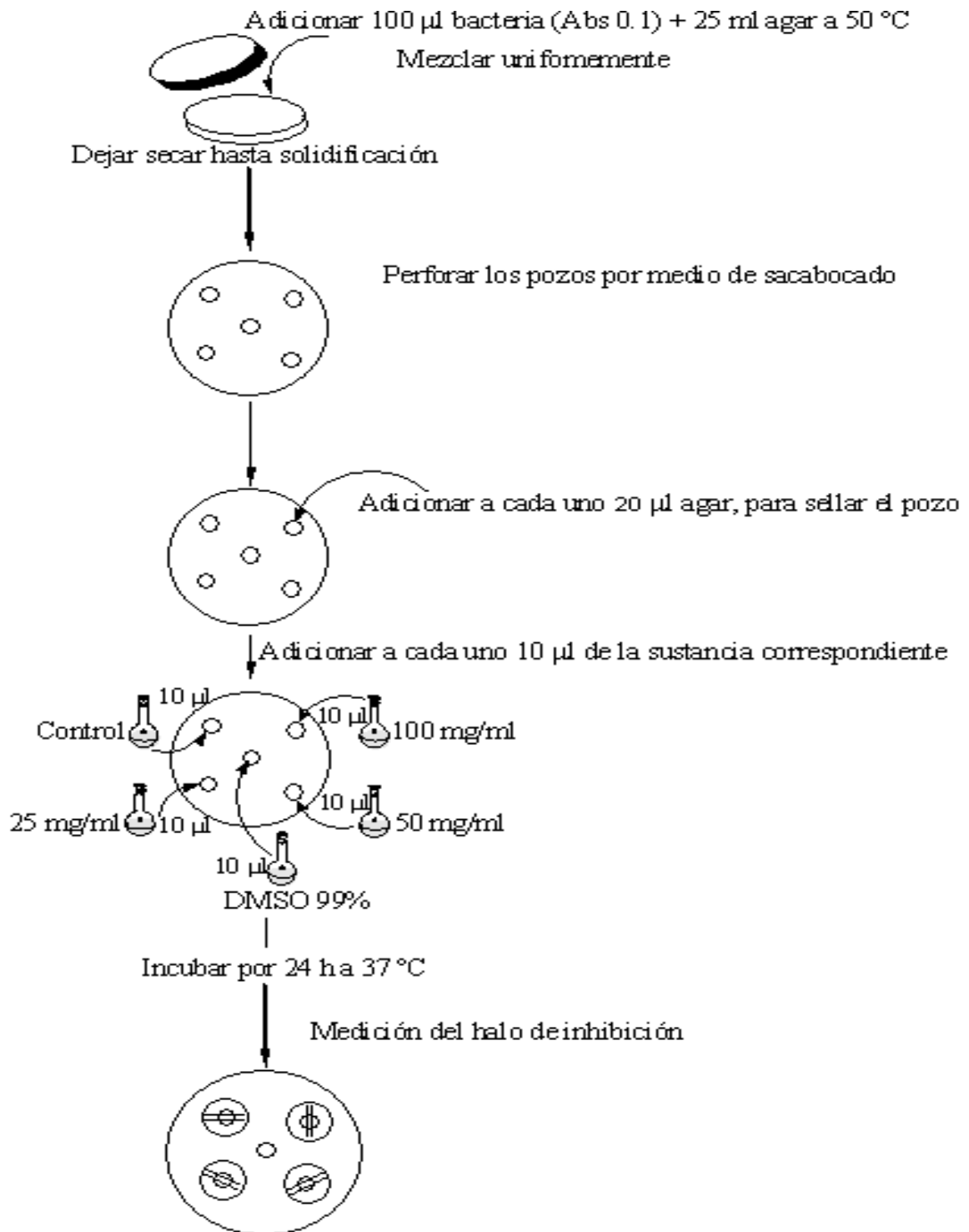


Figura 19. Método de difusión en agar (Tomado de MARIN CASTAÑO, Darwin. Informe de avance del proyecto CENIVAM: Evaluación antibacteriana y antifúngica de esencias y extractos. No. 03 de 03. Septiembre de 2005)

6.8.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se utilizó como control positivo de inhibición el antibiótico de control ciprofloxacina en DMSO al 99% para *Bacillus cereus* y amoxicilina para *Streptococcus agalactiae* y los extractos CHCl₃-US y CHCl₃-AG, las cuales mostraron inhibición por medio del método de difusión en agar.

Para las pruebas de actividad antimicrobiana en microplaca de 96 pozos, se preparó una solución stock de cada extracto a una concentración de 64000 µg/mL en DMSO al 99%. A partir de la solución stock, se prepararon dos diluciones de 8000 y 500 µg/mL con DMSO al 99%. A partir de estas tres soluciones se hizo una segunda serie de once diluciones de la siguiente manera: De la solución stock de 64000 µg/mL se prepararon diluciones a 12800, 6400 y 3200 µg/mL; así mismo se prepararon de la solución de 8000 µg/mL diluciones a 1600, 800, 400 y 200 µg/mL; lo mismo se realizó con la solución de 500 µg/mL de donde se prepararon diluciones de 100, 50, 25, y 12.5 µg/mL. El blanco utilizado fue DMSO al 99%.

De cada una de las once diluciones previamente preparadas de cada extracto, se transfirieron 20 µL a los pozos de una fila enumerados del 1 al 11 y se adicionó el blanco en el pozo número 12. De esta manera en cada fila se lograron diluciones seriadas desde 1024 hasta 1 µg/mL. Cada extracto se repitió en tres filas, posteriormente se le adicionó a cada pozo 220 µL de medio de cultivo líquido (caldo nutritivo) y 10 µL del microorganismo ajustado a 0.1 de absorbancia. La lectura inicial se hizo a contra luz observando turbidez o transparencia después de 4 horas de incubación a 37 °C, se tomó como valor de CMI la concentración del primer pozo que presentó transparencia en cada fila. Posteriormente se realizó la adición de 25 µL de MTT (con una concentración de 0.8 mg/mL) utilizando como medio dispersante TRITON ó TWEEN 80 (con una concentración de 0.1 g/ml) a cada uno de los pozos con el microorganismo y se incubó a 37 °C durante 4 horas. La segunda lectura se hizo a través de un método colorimétrico. Como prueba confirmatoria se hizo una siembra por superficie en caja de petri con agar nutritivo, se adicionó 20 µL del contenido del pozo y se incubó por 24 horas a 37 °C, posteriormente se realizó la lectura observando inhibición o crecimiento, (Ver figura 20).

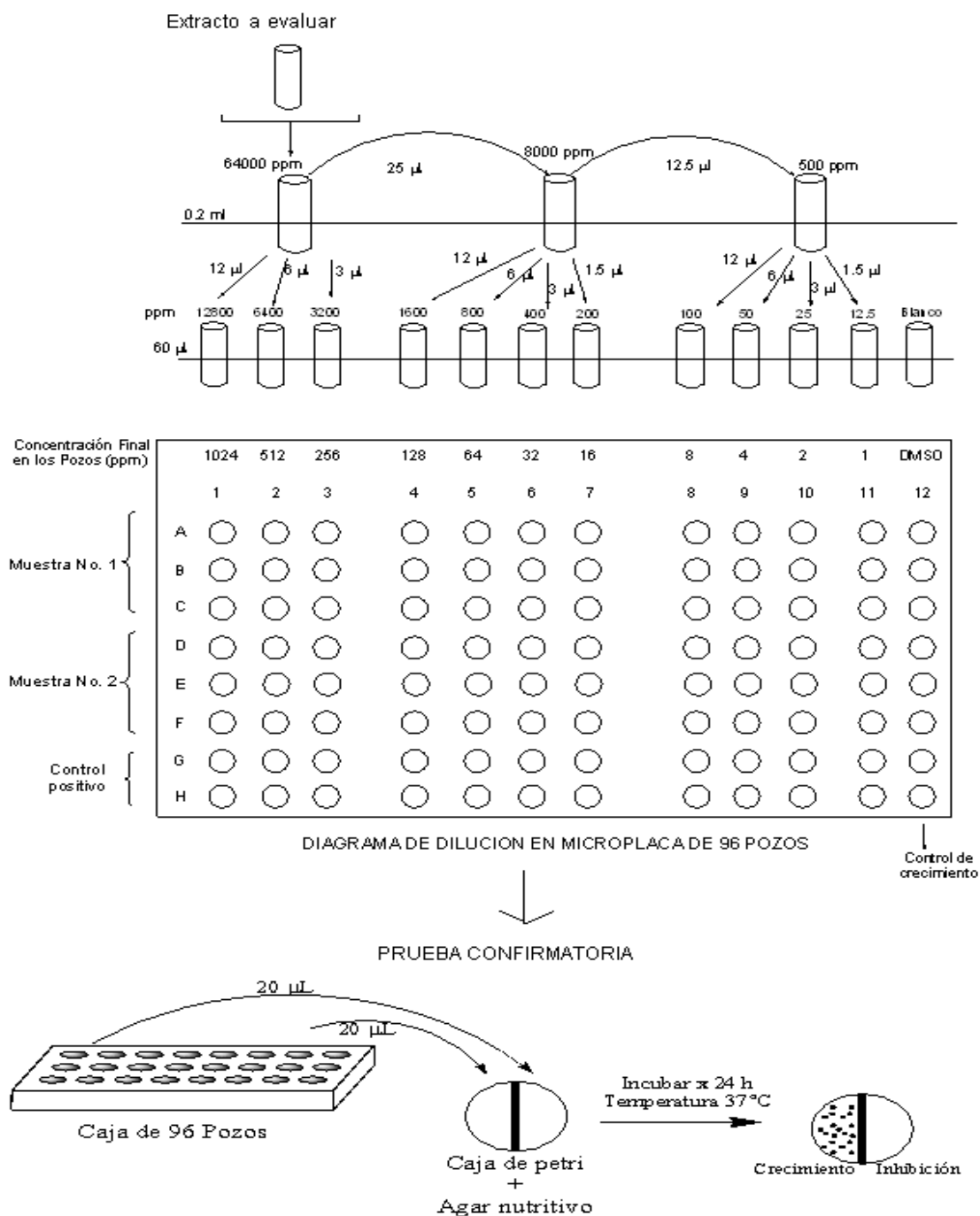


Figura 20. Diagrama de dilución en microplaca de 96 pozos (Tomado de MARIN CASTAÑO, Darwin. Informe de avance del proyecto CENIVAM: Evaluación antibacterial de esencias y extractos. No. 12 de 12. Diciembre de 2006)

6.9. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICOS, EN ACETATO DE ETILO, BUTANÓLICOS Y ACUOSOS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (CLAE)

Se realizó el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los extractos CHCl₃-US y CHCl₃-AG; AcOEt-US y AcOEt-AG; ButOH-US y ButOH-AG; Ac-US y Ac-AG, empleando las condiciones de análisis que se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Condiciones de operación del CLAE para análisis de alcaloides y fenoles

Cromatógrafo	JASCO HPLC Plus
Automuestreador	AS – 2059 Plus
Bomba	Gradiente Cuaternario PU – 2089 Plus
Horno para columna	CO – 2065 Plus
Columna	Ultra Aqueous RP-18 3 µm, 3.2 mm DI x 100 mm largo
Detector	DAD MD – 2015 Plus
Software	EZ Cromh Elite
Flujo	0.5 ml / min
Gradiente	Ácido fosfórico (0.05%) – acetonitrilo (5.0%) Inicial (95 – 5) 5 min (95 – 5) 15 min (75 – 25) 20 min (75 – 25) 22 min (95 – 5) 25 min (95 – 5)
Tiempo de corrida	30 min
Detector	230 – 450 nm
Volumen de Inyección	10 µL
Temperatura	40 °C

6.9.1. Cuantificación e Identificación de alcaloides y fenoles por CLAE

La cuantificación de alcaloides y fenoles se hizo por el método del estándar externo empleando una curva de calibración en cada caso. Para la determinación de alcaloides se emplearon los estándares de teobromina, cafeína y teofilina y para fenoles se uso ácido ferúlico, a una longitud de onda de 270 y 320 nm respectivamente, utilizando concentraciones de 6.25 a 200 µg/mL (Ver Anexo 2). Las corridas se hicieron por triplicado.

La identificación de alcaloides se llevó a cabo por comparación con el tiempo de retención de los estándares analizados bajo las mismas condiciones de análisis. En el caso de los fenoles se hizo con base en su espectro ultravioleta obtenido en la separación cromatográfica para cada uno de los picos.

6.10. ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES / ESPECTROMETRIA DE MASAS (CG / EM)

Se realizó el análisis de los extractos CHCl₃-US y CHCl₃-AG por CG/EM con las condiciones de análisis que se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Condiciones de operación por CG/EM para análisis de los extractos clorofórmicos

Cromatógrafo	Shimadzu QP 2010
Inyector	Autoinyector Shimadzu AOC – 20I
Columna capilar	Rtx-5Sil MS Crossbond (5% difenil / 95% dimetilpolisiloxano) Espesor partícula 0.25 µm, ø = 0.25 mm x 30 m largo
Detector	Espectrómetro de masas MS – UP 2010 system
Inyector	Temperatura: 280 °C Volumen de inyección: 1.0 mL Modo de inyección: Split
Gas	He Flujo total: 1 mL/minuto Presión: 73 kPa
Detector	Temperatura del detector: 260 °C Ionización: Impacto Electrónico a 70 eV Modo de Adquisición de Datos: SCAN
Programación de temperatura	T1: 100 °C / 2 minutos R1: 10 °C / min T2: 320 °C / 10 minutos Tiempo total de corrida: 30 minutos

Los reactivos, cepas e instrumentos utilizados se encuentran en el anexo 3.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. COMPARACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO DE ULTRASONIDO (US) Y AGITACIÓN MAGNÉTICA (AG)

En la tabla 5 se presentan los resultados del porcentaje de rendimiento de los extractos clorofórmicos (**CHCl₃-US y CHCl₃-AG**), en acetato de etilo (**AcOEt-US y AcOEt-AG**), butanólicos (**ButOH-US y ButOH-AG**) y acuosos (**Ac-US y Ac-AG**) obtenidos según el fraccionamiento líquido – líquido propuesto en la sección experimental. Los datos corresponden al peso del extracto frente al peso de cáscara de cacao molida y desengrasada (Ver Anexo 4) y según su desviación estándar se puede concluir que los valores logrados por ambos métodos de extracción son reproducibles y confiables.

Tabla 5. Comparación de la eficiencia de extracción de las técnicas empleadas

Extracto	Porcentaje de rendimiento	Porcentaje de rendimiento promedio	Desviación estándar
CHCl ₃ -US	0,5153	0.4969	0.0217
	0,5024		
	0,4729		
CHCl ₃ -AG	0,3825	0.4081	0.0243
	0,4109		
	0,4308		
AcOEt-US	0,3199	0.3204	0.0026
	0,3232		
	0,3182		
AcOEt-AG	0,2746	0.2774	0.0025
	0,2796		
	0,2780		
ButOH-US	1,0113	1.0140	0.0025
	1,0145		
	1,0161		
ButOH-AG	0,8539	0.8511	0.0026
	0,8489		
	0,8572		
Ac-US	15,0273	15.0274	0.0055
	15,0330		
	15,0220		
Ac-AG	8,1161	8.1215	0.0050
	8,1225		
	8,1260		

Con el fin de comparar la eficiencia en la extracción por las dos técnicas empleadas, se esquematizaron los datos de la tabla 5 en la figura 21 que corresponden al porcentaje promedio de cada uno de los extractos obtenidos. Como se aprecia en la figura, en todos los casos la técnica por ultrasonido favoreció la extracción de los componentes siendo más evidente en el extracto acuoso residual (Ver figura 21 **D**), alcanzándose una diferencia de 46% entre los extractos por ultrasonido y agitación magnética. Por lo tanto, se puede concluir que el método de ultrasonido proporcionó mejor rendimiento debido a que los efectos mecánicos de este sistema inducen una mayor penetración del disolvente en las paredes celulares del material y mejora la transferencia del contenido de masa, [82].

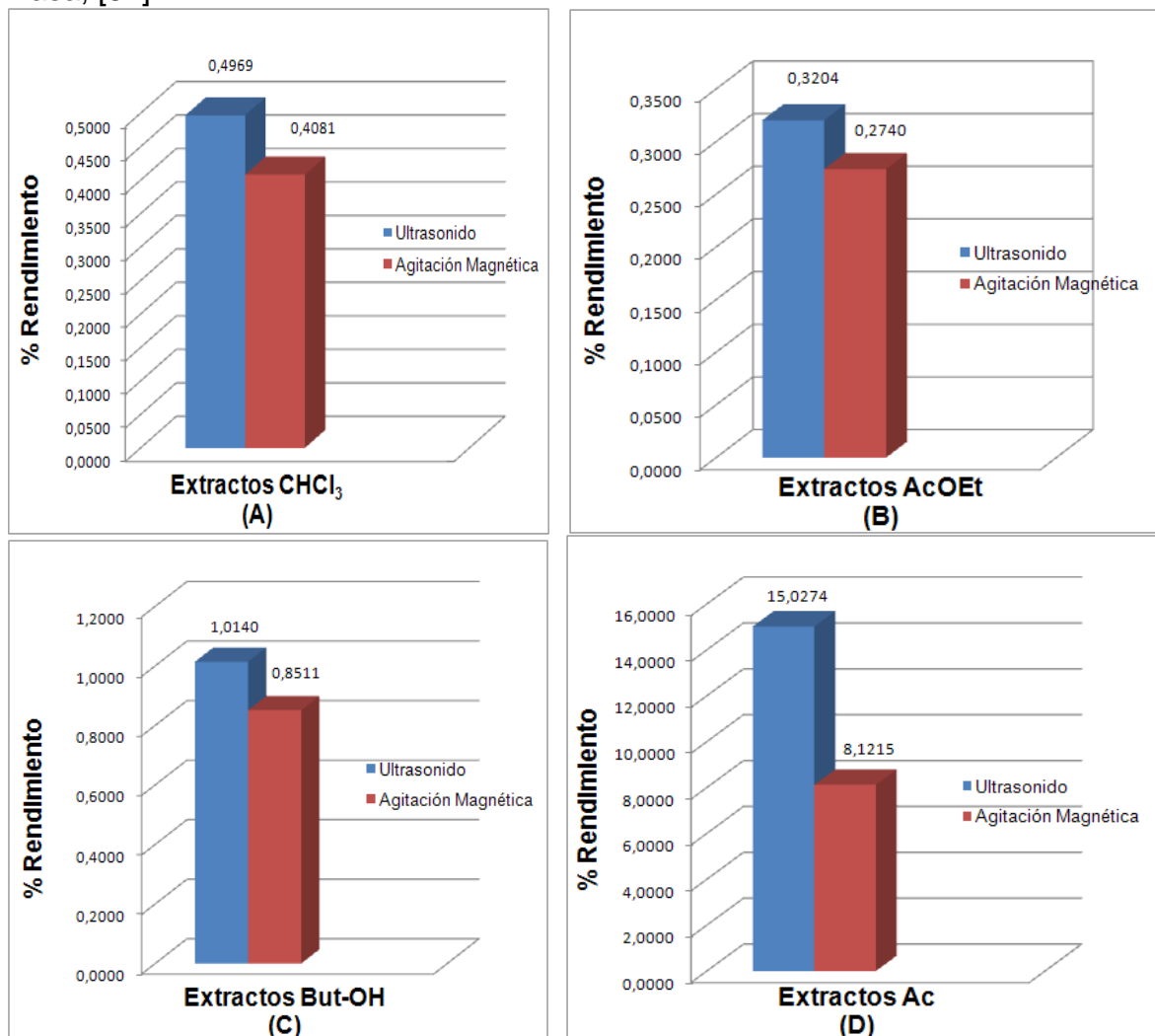


Figura 21. Porcentaje de rendimiento promedio del fraccionamiento líquido – líquido del extracto Etanol:Agua de Cáscara de Cacao con sus respectivos extractos: **(A)** Clorofórmico, **(B)** Acetato de etilo, **(C)** Butanólico, **(D)** Acuoso.

7.2. ANÁLISIS DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO OBTENIDO POR ULTRASONIDO Y AGITACIÓN MAGNÉTICA (CHCl₃-US y CHCl₃-AG)

7.2.1 Identificación preliminar por cromatografía de capa delgada (CCD)

De acuerdo con la separación por CCD de los extractos clorofórmicos CHCl₃-US y CHCl₃-AG obtenidos por las dos técnicas de extracción empleadas (ultrasonido y agitación magnética), no se encontraron diferencias significativas en los compuestos separados. Como se aprecia en la figura 22 (Ver placas originales en Anexo 5), en ambos casos se encontraron igual número de manchas con los mismos R_f que según los estándares de alcaloides empleados corresponden a teobromina (R_f = 0.85) y teofilina (R_f = 0.36), indicando que no hay una diferencia significativa en la selectividad de la extracción entre el método de ultrasonido y agitación magnética.

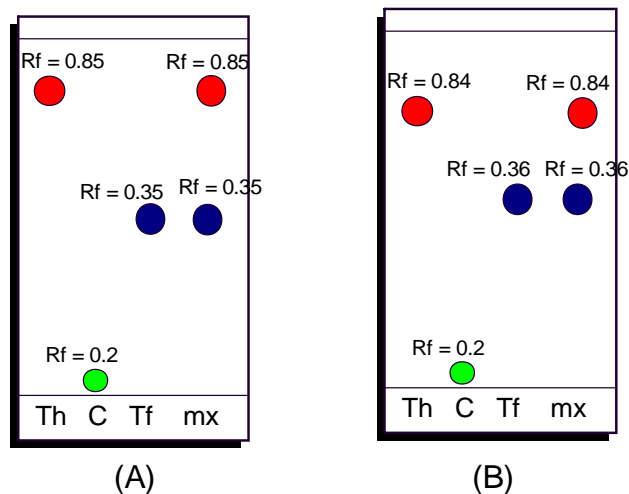


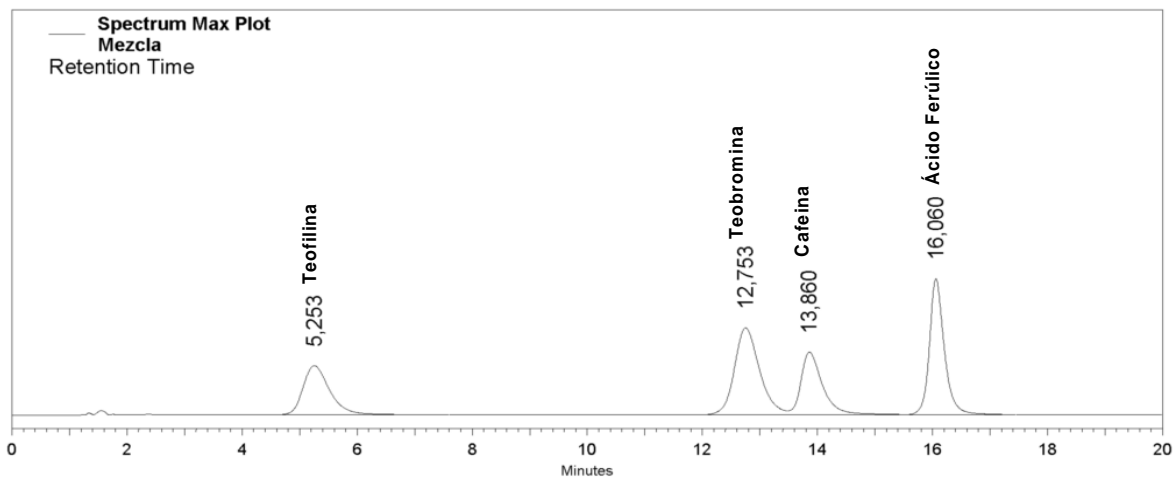
Figura 22. Diagrama Esquemático de CCD para los extractos Clorofórmicos revelados con luz ultravioleta a longitud de onda corta, obtenidos por:

(A) Ultrasonido, **(B)** Agitación magnética.

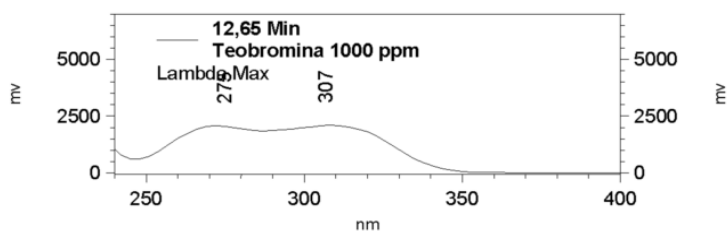
Th = Teobromina; **C** = Cafeína; **Tf** = Teofilina; **mx** = Extracto Clorofórmico.

7.2.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

En la figura la figura 23 A se aprecia la separación cromatográfica por CLAE de los estándares de alcaloides y fenoles corridos de forma simultánea. Como se observa en el cromatograma las condiciones empleadas lograron una buena separación de los compuestos sin superposición lo que permitió el análisis y detección de alcaloides y fenoles en todos los extractos obtenidos. Como se observa en los perfiles cromatográficos obtenidos para los extractos clorofórmicos por ultrasonido y agitación magnética (Ver figuras 24 **A** y **B**), en ambos cromatogramas se identificaron teofilina y cafeína por tiempo de retención con los estándares empleados. Sin embargo solamente en el extracto por agitación magnética (Ver figura 24 **B**) se pudo detectar la presencia de teobromina.

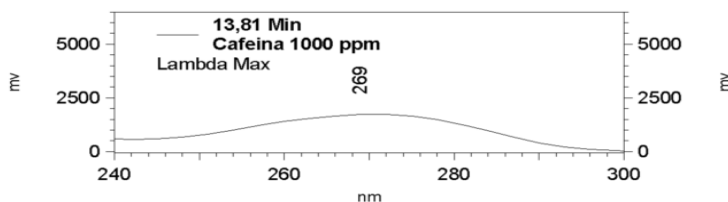


(A)



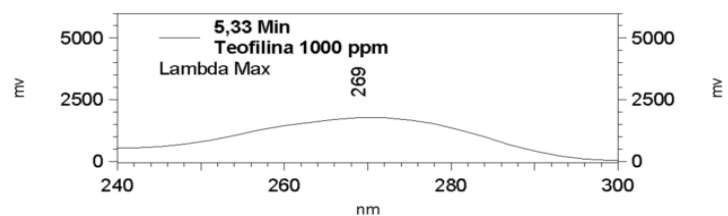
Retention time: 12,653 Min
Peak name:
Lambda max: 307, 275
Lambda min: 396, 248, 289

(1)



Retention time: 13,807 Min
Peak name:
Lambda max: 269, 330, 376
Lambda min: 396, 363, 321

(2)

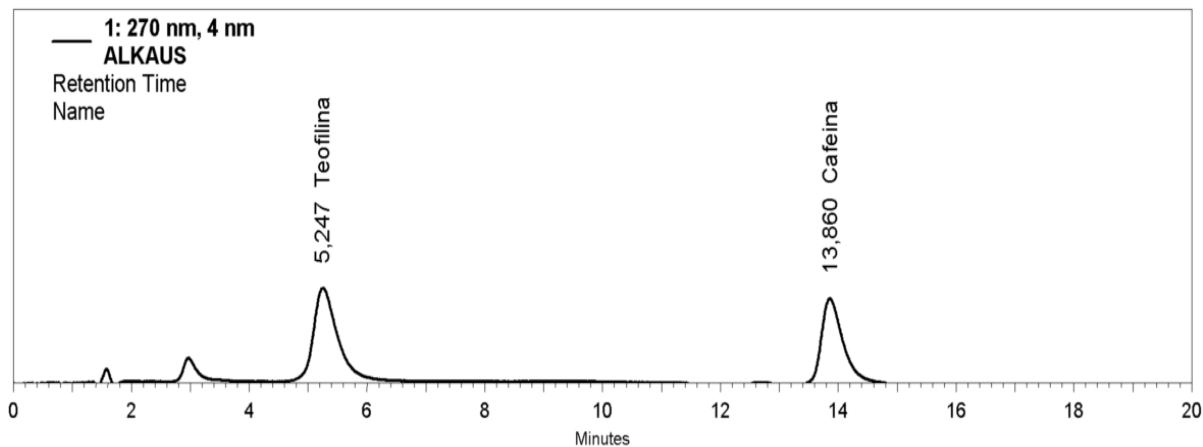


Retention time: 5,333 Min
Peak name:
Lambda max: 269, 330, 373
Lambda min: 362, 321, 236

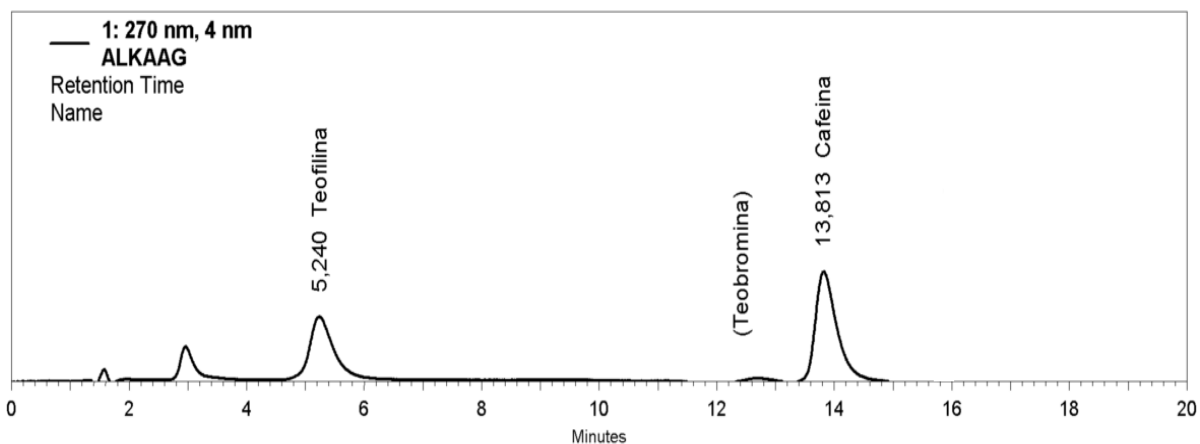
(3)

(B)

Figura 23. A. Separación cromatográfica por CLAE de los estándares de alcaloides (teobromina, teofilina y cafeína) y de fenoles (ácido ferúlico).
B. Espectros ultravioleta de los estándares de teobromina (1), cafeína (2), teofilina (3)



(A)



(B)

Figura 24. Cromatogramas por CLAE del extracto clorofórmico de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) obtenido por: (A) Ultrasonido (CHCl_3 -US) y (B) Agitación magnética (CHCl_3 -AG)

Según la cuantificación de los alcaloides (Ver anexo 6) en los extractos analizados el mayoritario fue cafeína (Ver tabla 6). Sin embargo hay que tener en cuenta que la cuantificación de la teofilina no fue posible en este estudio debido al reparto que tuvo este alcaloide a lo largo del fraccionamiento líquido – líquido y a su presencia en todos los extractos obtenidos indicando que este es el principal alcaloide en la cáscara. Otros autores, [40 y 41], han reportado a la teobromina como el alcaloide mayoritario en el grano pero no se encontraron reportes de la distribución de alcaloides en la cáscara. Los espectros ultravioleta de los alcaloides identificados en los extractos clorofórmicos obtenidos por ultrasonido y agitación magnética se encuentran en el anexo 7.

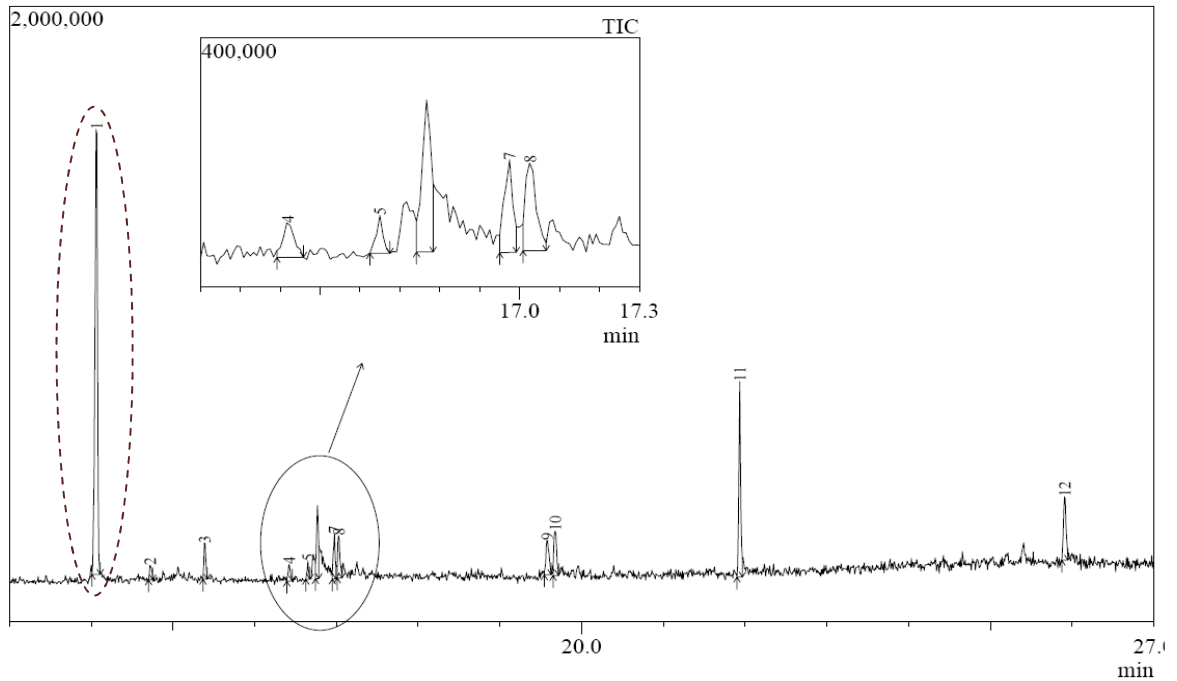
Tabla 6. Cuantificación de alcaloides por CLAE de los extractos clorofórmicos

Estándar	Tiempo de retención (min)	Extracto CHCl ₃ -US	Extracto CHCl ₃ -AG
		Concentración (mg/L)	
Teobromina	12,75	ND	NC
Cafeína	13,86	7,77	10,31
Teofilina	5,24	NC	NC

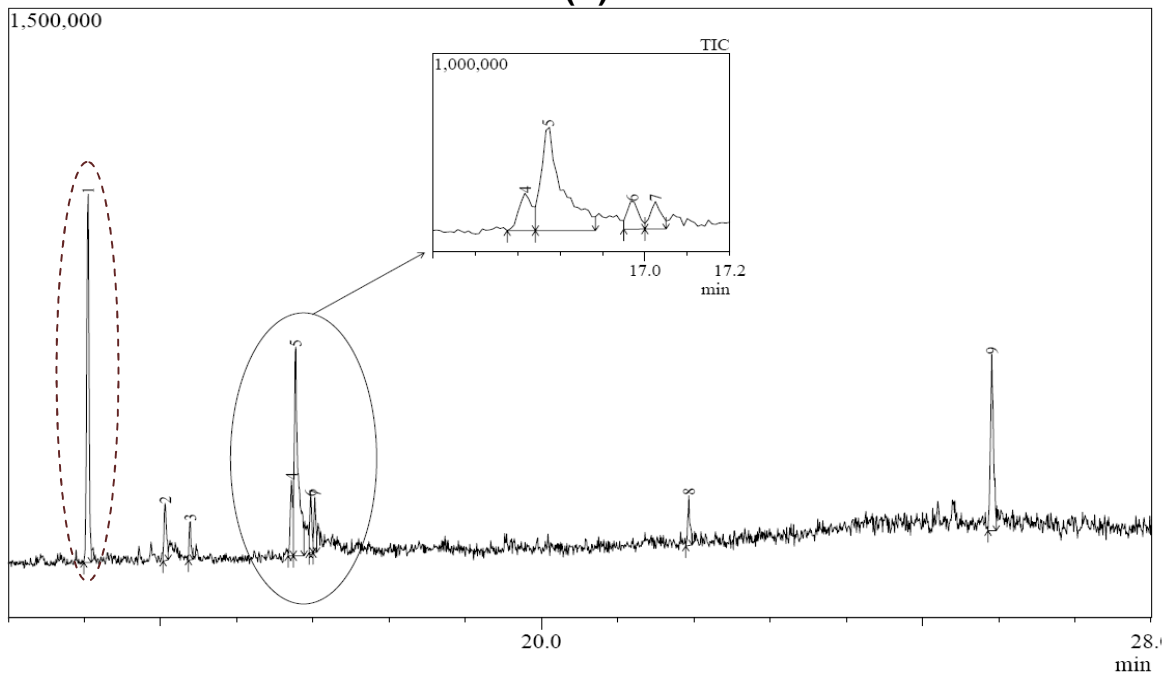
Los valores de concentración corresponden al promedio de tres medidas tomadas de forma independiente cada una. ND = No detectado. NC = No cuantificado

7.2.3. Análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM)

El análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) fue complementario y permitió confirmar la presencia de cafeína como alcaloide mayoritario en los extractos clorofórmicos. De acuerdo con los perfiles logrados por cromatografía de gases para los extractos CHCl₃-US y CHCl₃-AG obtenidos por ultrasonido y agitación magnética respectivamente (Ver figura 25), se aprecia un pico bien resuelto que se identificó como cafeína con un tiempo de retención de 14 minutos en ambos casos, cuyo peso molecular es de 194 gramos/mol. Este pico fue identificado por comparación con los espectros de masas de la biblioteca WILEY 7 N° 2 (Ver Anexo 8). El espectro de masas de la cafeína (Ver figura 26) posee un pico base con un m/z de 194 y los fragmentos más representativos (Ver anexo 9) fueron el m/z 109, m/z 165, m/z 137, m/z 109, m/z 82, m/z 67 y m/z 55 (Ver tabla 7) conforme a otros autores, [83]. Sin embargo no se descarta la presencia y superposición de teobromina y teofilina debido a que pueden existir en mezcla con la cafeína. Los picos del cromatograma con tiempo de retención de 16,67 minutos, 21,93 minutos y 21,95 minutos corresponden posiblemente de acuerdo a sus espectros de masas (Ver Anexo 10), a ácidos grasos puesto que presentan fragmentos característicos de este grupo de compuestos que también han sido reportados para granos de cacao según otros autores, [84, 85, 86 y 87], sin embargo no se descarta la superposición entre ellos o con otros ácidos grasos por encontrarse en mezcla.

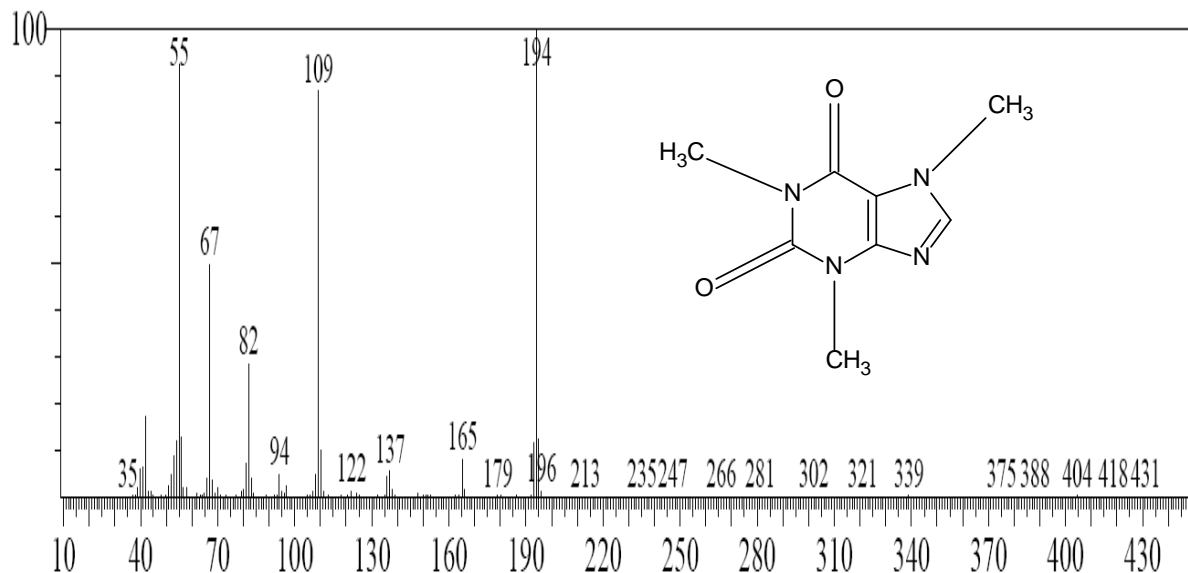


(A)

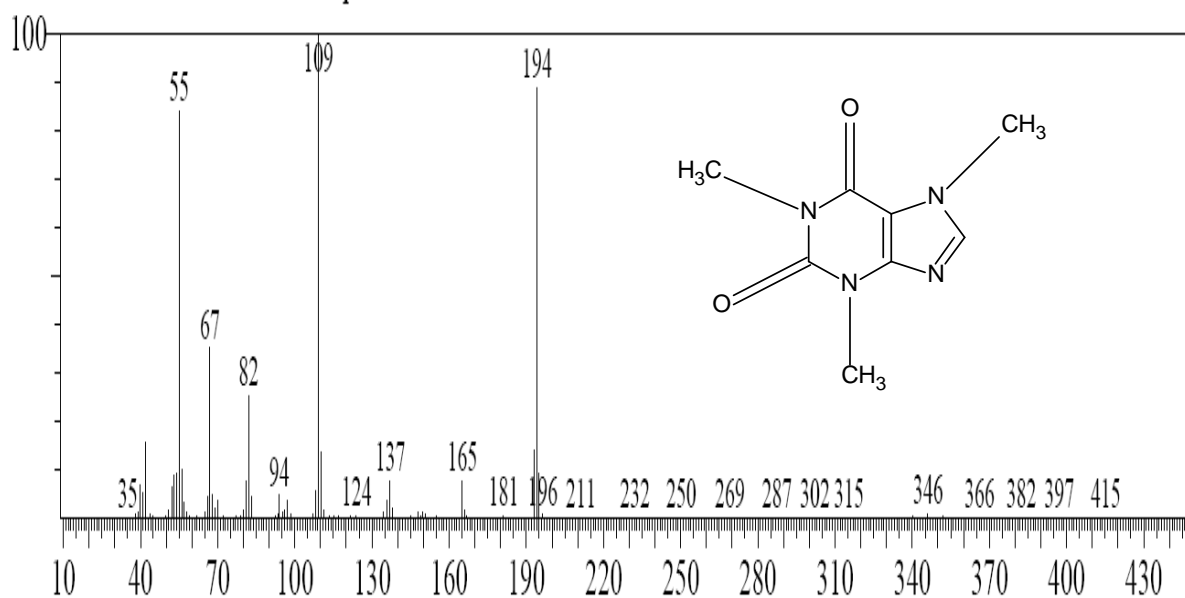


(B)

Figura 25. Cromatogramas por cromatografía de gases del extracto clorofórmico de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) obtenido por: **(A)** Ultrasonido (CHCL₃-US) y **(B)** Agitación magnética (CHCL₃-AG)



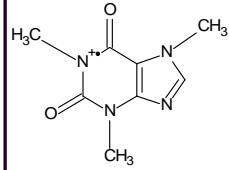
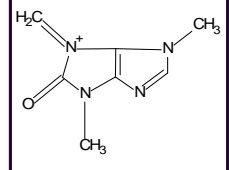
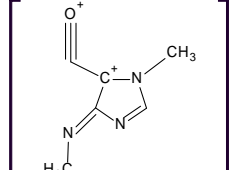
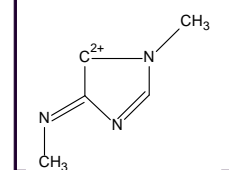
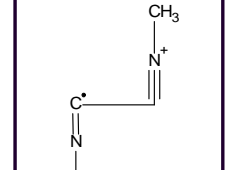
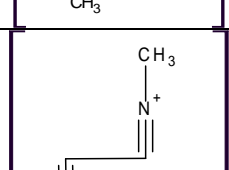
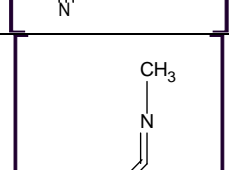
(A)



(B)

Figura 26. Espectro de masas de la cafeína en el extracto clorofórmico de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) obtenido por: **(A)** Ultrasonido (CHCl₃-US) y **(B)** Agitación magnética (CHCl₃-AG)

Tabla 7. Fragmentos representativos de la cafeína encontrados en cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.)

Compuesto	Relación (m/z)	% Abundancia	Fragmento
Cafeína	194	100	
	165	10	
	137	40	
	109	89	
	82	30	
	67	50	
	55	93	

7.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO EN ACETATO DE ETILO OBTENIDO POR ULTRASONIDO Y AGITACIÓN MAGNÉTICA (AcOEt-US y AcOEt-AG)

7.3.1. Identificación preliminar por cromatografía de capa delgada (CCD)

En la figura 27 se esquematiza la separación por CCD de los extractos en acetato de etilo obtenidos por los métodos de extracción de ultrasonido y agitación magnética (Ver placas originales en Anexo 11). Según la placa cromatográfica, en ambos extractos (**A y B**) se evidenció una mancha de $R_f = 0.84$ revelada con luz ultravioleta a onda corta y larga. El estándar empleado en este caso fue el ácido ferúlico ($R_f = 0.87$), el cual se reveló de la misma forma, lo que podría indicar que la mancha observada puede ser un compuesto de tipo fenólico.

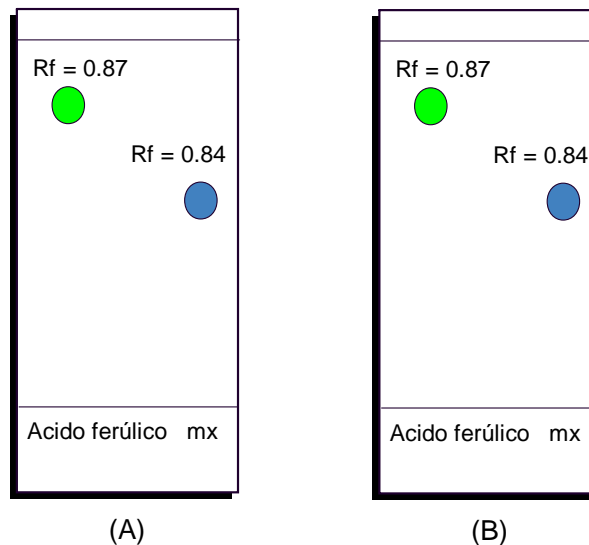


Figura 27. Diagrama Esquemático de CCD para los extractos en acetato de etilo revelados con luz ultravioleta a onda corta, obtenidos por: **(A)** Ultrasonido, **(B)** Agitación magnética. **mx** = Extracto en acetato de etilo.

7.3.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

En la figura 23 A se observa claramente la separación cromatográfica del estándar que se empleó para los fenoles (ácido ferúlico) y que se corrió bajo las mismas condiciones con los estándares de alcaloides. El espectro UV del estándar de ácido ferúlico se observa en la figura 28, presentando absorbancias a alrededor de 280 nm y cerca de 360 nm, características de compuestos de tipo fenólico.

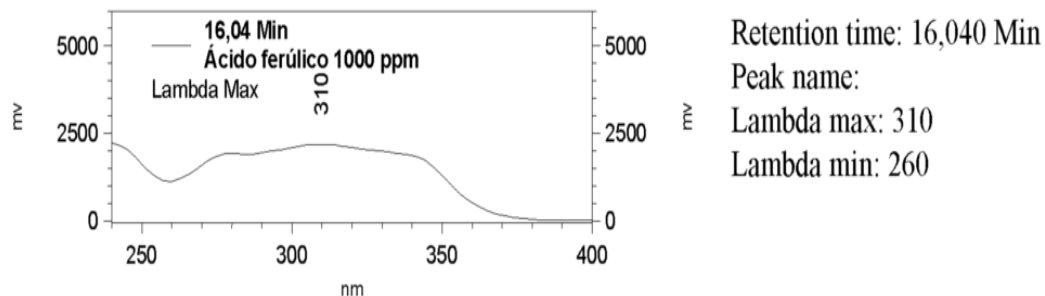


Figura 28. Espectro ultravioleta del estándar de ácido ferúlico

En los perfiles cromatográficos de los extractos en acetato de etilo obtenidos por ultrasonido y agitación magnética (Ver figuras 28 **A** y **B**), se aprecian 5 picos, donde los 4 primeros eluyeron antes de 3 minutos y se encuentran superpuestos mientras que el pico mayoritario eluyó a 5,1 minutos en ambos casos. Este pico coincide con el tiempo de retención de la teofilina, indicando que este alcaloide sigue presente en este extracto a pesar del número de fraccionamientos líquido – líquido que se realizaron con cloroformo.

Los picos que aparecieron con un tiempo de retención entre 1,3 a 3,6 minutos presentaron un espectros ultravioleta con máximos de absorbancia entre 280 y 340 nm, indicando que pueden tratarse de compuestos de tipo fenólico, [88 y 89], en el cual un anillo A (Ver figura 29) que representa el sistema benzoilo muestra la banda II que en el UV absorbe entre 240 a 280 nm y un anillo B el cual puede tener un cromóforo a partir del carbonilo denominado como sistema cinamoilo exhibe la banda I, con máximos de absorbancia entre 340 a 380 nm, [90, 91 y 92].

La baja concentración de estos picos pudo deberse a una extracción insuficiente de los mismos ó a que están presentes en las otras fracciones. Se propone para próximos estudios realizar hidrólisis del extracto acuoso generado después de la extracción con cloroformo y enriquecer el contenido de fenoles en esta fracción. Los espectros se presentan en el anexo 12.

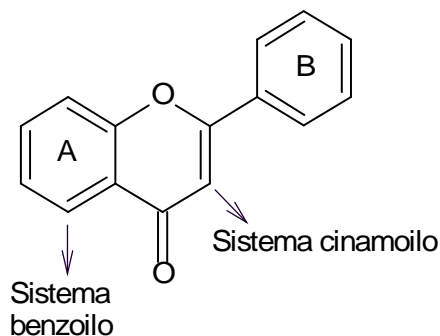
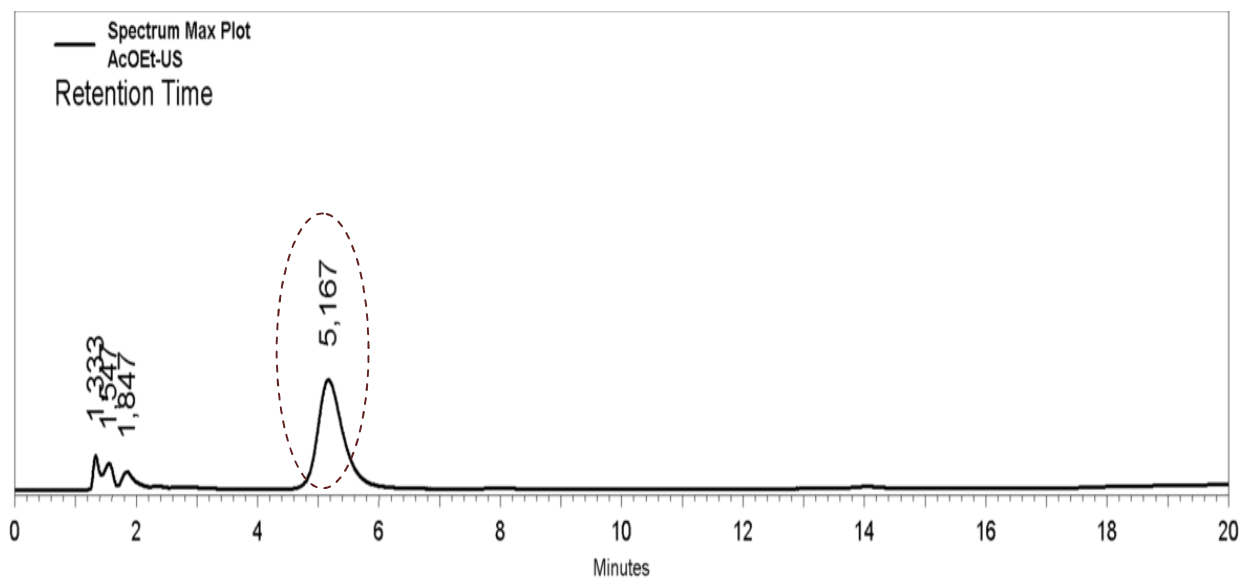
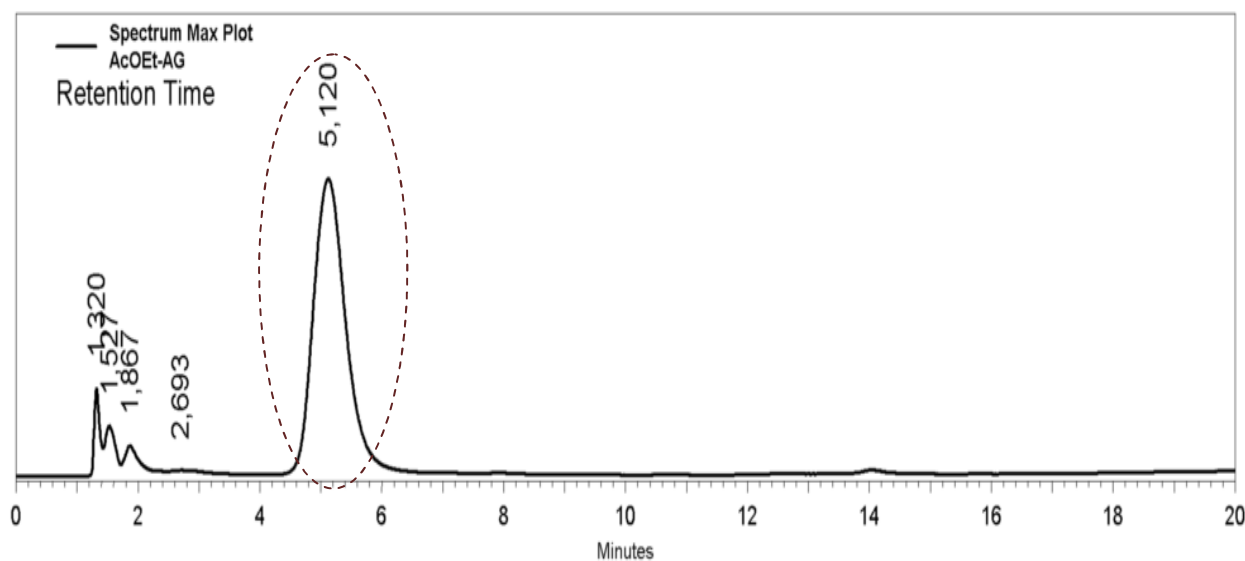


Figura 29. Estructura Fenólica



(A)



(B)

Figura 28. Cromatogramas por CLAE del extracto en acetato de etilo de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) obtenido por: **(A)** Ultrasonido (AcOEt-US) y **(B)** Agitación magnética (AcOEt- AG)

7.3.3. Cuantificación de fenoles totales

Para este fin se emplearon dos técnicas diferentes. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido ferúlico, se analizaron en primer lugar cada uno de forma independiente y luego de forma comparativa.

7.3.3.1. Determinación directa a 280 nm

La curva de calibración construida arrojó un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.997$ y de acuerdo con la curva de Ringbom (Ver Anexo 13) el rango óptimo y lineal se encuentra entre 0 a 30 ppm. Como se aprecia en la tabla 8 los resultados de cuantificación arrojaron un contenido promedio de 264.42 ± 3.47 mg f. totales / g extracto para AcOEt-AG, siendo mayor el contenido encontrado para AcOEt-US con un valor de 323.58 ± 3.84 mg f. totales / g extracto. Los valores encontrados no concuerdan con lo reportado para otros estudios de cacao, por lo que se analizarán las posibles causas de estos resultados en el ítem 7.3.3.3. Esta técnica se fundamenta en la propiedad que tienen todas las sustancias fenólicas de absorber luz ultravioleta a 280 nm. Uno de los factores que deben tenerse en cuenta como interferencias es que a ésta longitud de onda absorben otro tipo de compuestos, principalmente aquellos que contienen enlaces dobles carbono – carbono y carbono – oxígeno dificultando la lectura para el contenido total de fenoles, además cada tipo de compuestos fenólicos posee un coeficiente de absorción, diferente a 280 nm generando así que los resultados no se puedan relacionar con un estándar específicamente utilizado, por lo tanto su uso es limitado. Sin embargo el valor de éste método radica en que es rápido, simple y económico, puesto que la muestra a analizar requiere solo de filtración y dilución, [93]. Esta técnica es apropiada para determinar el contenido total de fenoles en control de procesos como por ejemplo para realizar seguimiento del contenido de fenoles de vino durante las diversas etapas de procesamiento del mismo.

7.3.3.2. Determinación de Fenoles Totales por el método de Folin – Ciocalteu

La curva de calibración mostró buena linealidad, con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.998$ y de acuerdo a la curva de Ringbom (Ver Anexo 14) presenta un rango óptimo y lineal entre 2 a 18 ppm. Como se observa en la tabla 8, la cuantificación de fenoles totales arrojó un valor promedio de 91.64 ± 1.30 mg f. totales / g extracto para el extracto obtenido por agitación magnética (AcOEt-AG), siendo mayor el contenido para el extracto de ultrasonido (AcOEt-US) con un valor de 111.38 ± 1.41 mg f. totales / g extracto. Estos están dentro del rango encontrado para otros análisis de cacao por lo que se analizará su confiabilidad en el siguiente ítem. Este método de cuantificación implica la oxidación inicial del fenol a quinona y la reducción simultánea del molibdeno del estado de oxidación +6 de color amarillo a otros inferiores, luego en alguno de sus estados se acompleja con un ligando que puede ser agua, sodio ó carbonato formando un complejo de color azul, indicando que se obtiene un derivado únicamente proveniente de compuestos fenólicos y generando por consiguiente una lectura certera del contenido total de fenoles. Esta técnica tiene la ventaja de

reportar un contenido total de fenoles equivalente a los diferentes tipos de compuestos fenólicos que se encuentren en la muestra analizada, [93], sin embargo posee la desventaja de que pueden existir interferencias cuando está presente el dióxido de azufre (aplica particularmente para análisis de fenoles en vinos) y glucósidos que generarían reportes de valores más bajos del contenido total de fenoles. Además la técnica es más compleja, requiere mayor tiempo de análisis y es costosa debido al uso obligatorio del reactivo fosfomolibdico – tungsteno que aunque está disponible comercialmente posee un alto valor monetario. Otra desventaja es que las soluciones resultantes son catalogadas como residuos peligrosos haciendo necesario crear un plan de desactivación adecuado. Cabe resaltar que la técnica de Folin – Ciocalteu es ampliamente usada en los análisis de vino, té, vegetales y frutas.

Tabla 8. Concentración de fenoles totales de extractos en acetato de etilo frente al método a 280 nm y Folin – Ciocalteu

Método	Extracto	Concentración (mg f totales /g ext)
280 nm	AcOEt–US	323.58 ± 3.84*
	AcOEt–AG	264.42 ± 3.47*
Folin – Ciocalteu	AcOEt–US	111.38 ± 1.41*
	AcOEt–AG	91.64 ± 1.30*

*Resultados expresados como media y desviación estándar de 3 réplicas.

7.3.3.3. Comparación del método directo a 280 nm y Folin-Ciocalteu

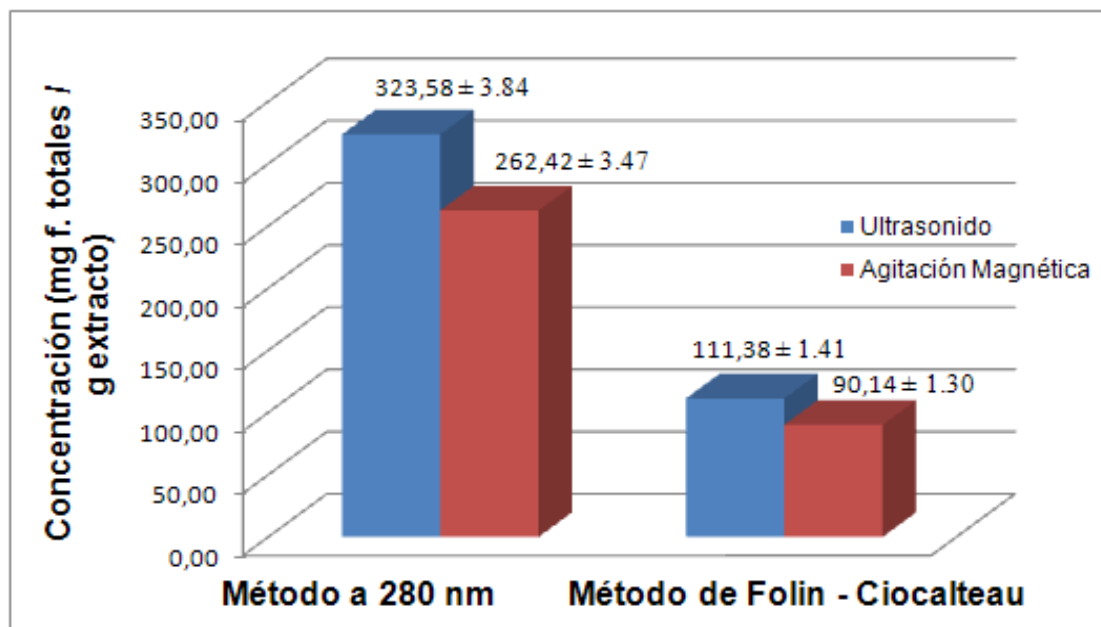


Figura 30. Comparación de la cantidad de fenoles totales expresados como ácido ferúlico de los extractos en acetato de etilo de cáscara de cacao

Como se puede ver en el histograma (Ver figura 30), el método a 280 nm reportó un contenido total de fenoles mayor que el método de Folin – Ciocalteau siendo aproximadamente 3 veces mayor. De acuerdo con estudios previos, los reportes indican que el grano de cacao tiene un rango de concentración de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido ferúlico comprendido entre 67 a 144 mg / g extracto, incluidos granos frescos, [94] y fermentados, [95]. Luego el contenido reportado por el método a 280 nm está sobrestimado, esto podría explicarse con base en el hecho de que en la región ultravioleta del espectro electromagnético se da la absorción de compuestos con transiciones electrónicas del orden $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$ conforme a aromáticos, conjugaciones de dobles enlaces y heteroátomos como el nitrógeno con pares de electrones libres que conforma la estructura de la teofilina como lo confirma el análisis por CLAE en la sección anterior, interfiriendo en la lectura y contribuyendo ó aportando a incrementar la absorbancia. Con base en otros autores, [55], y con la concentración reportada por el método de Folin – Ciocalteau que está dentro del rango reportado para granos de cacao, esta técnica es la más apropiada para determinar cuantitativamente la concentración de fenoles totales en extractos en acetato de etilo de cáscara de cacao puesto que las determinaciones se hacen a 820 nm y se limita las transiciones electrónicas dadas en la región ultravioleta e interferencias con el solvente empleado en la extracción, además el complejo generado es más estable que en la técnica anterior, por lo tanto la reproducibilidad es mayor. Cabe resaltar que el contenido total de fenoles encontrado en el presente trabajo para extractos en acetato de etilo de cáscara de cacao es significativamente mayor que el reportado en hojas de cacao con un valor de 1.9 mg / g extracto, [96]. Adicionalmente, el contenido de fenoles totales para cáscara de cacao es superior comparado con lo reportado en extractos acuosos de algas marinas *Bryothamnion triquetrum* y en extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, con un valor de 8.05 mg / g extracto y 3.1 mg / g extracto respectivamente, [97 y 98].

Se concluye que respecto a las técnicas de extracción como se observa claramente en la figura 30, no se aprecia una diferencia significativa en el contenido total de fenoles, de tal manera que ambos métodos de extracción produjeron similar eficiencia para la cuantificación mediante el método de Folin – Ciocalteau. El contenido total de fenoles es importante ya que puede ser un indicador útil de un potencial beneficio nutricional, [99], y como la cáscara de cacao presenta niveles significativamente altos, se sugiere realizar posteriores estudios nutricionales sobre este agrodesecho para complementar la presente investigación y generar nuevas utilidades sobre la cáscara contribuyendo a la disminución del impacto ambiental que ella produce.

7.4. ANÁLISIS DEL EXTRACTO BUTANÓLICO Y ACUOSO OBTENIDO POR ULTRASONIDO Y AGITACIÓN MAGNÉTICA (ButOH-US y ButOH-AG, Ac-US y Ac-AG)

Debido a la presencia de teofilina, evidenciada por CLAE en las fracciones en acetato de etilo anteriores, se hizo una extracción con butanol con el fin de retener este alcaloide y estudiar en la fracción acuosa residual los componentes presentes. En las figuras 31 y 32 se presentan los cromatogramas obtenidos por CLAE de los extractos butanólicos y acuosos corridos en las mismas condiciones los extractos cloróformicos.

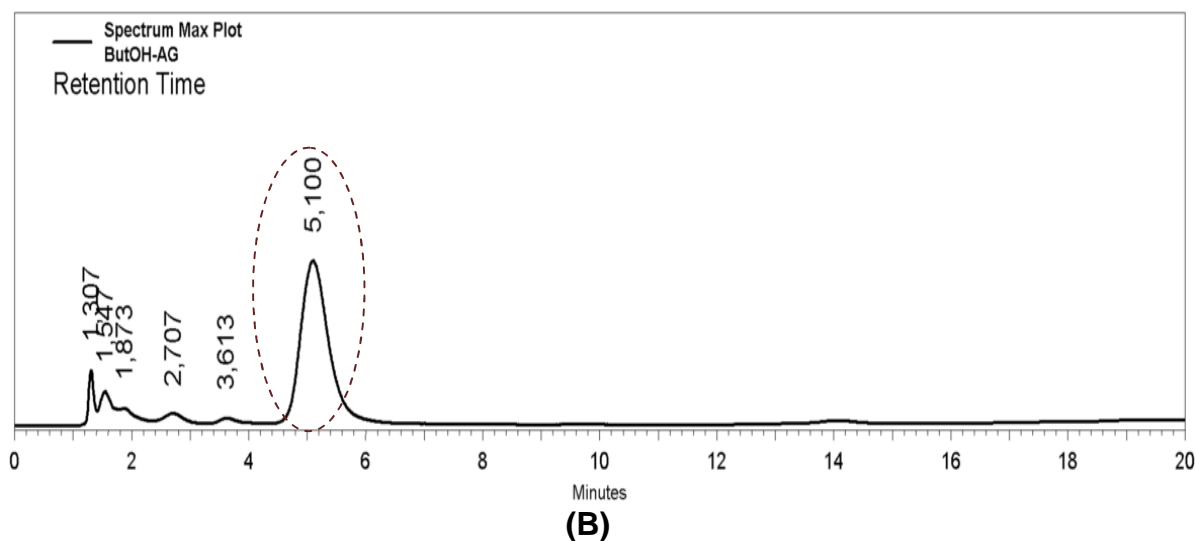
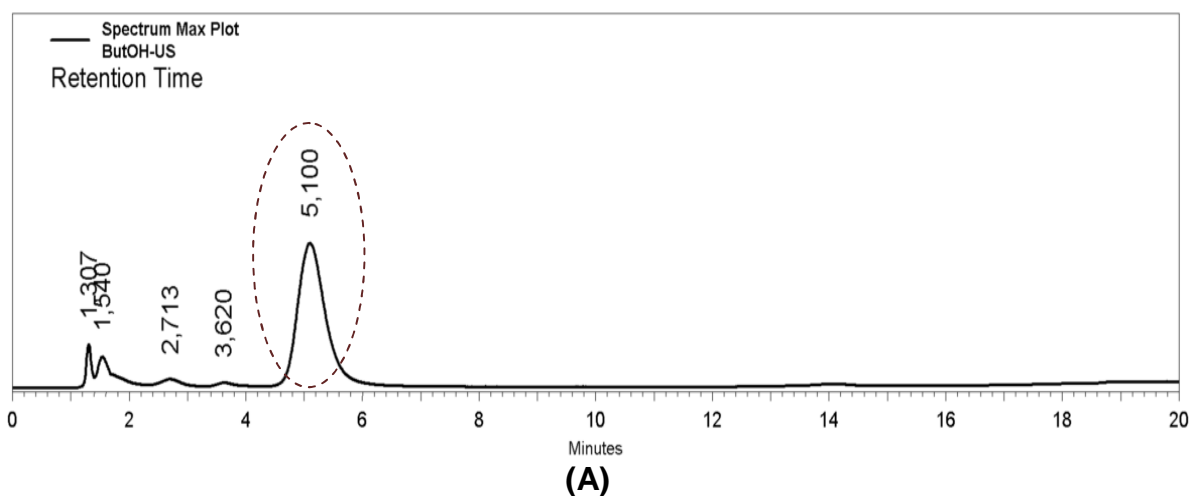


Figura 31. Cromatogramas por CLAE del extracto butanólico de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) obtenido por:
(A) Ultrasonido (ButOH-US) y **(B)** Agitación magnética (ButOH-AG)

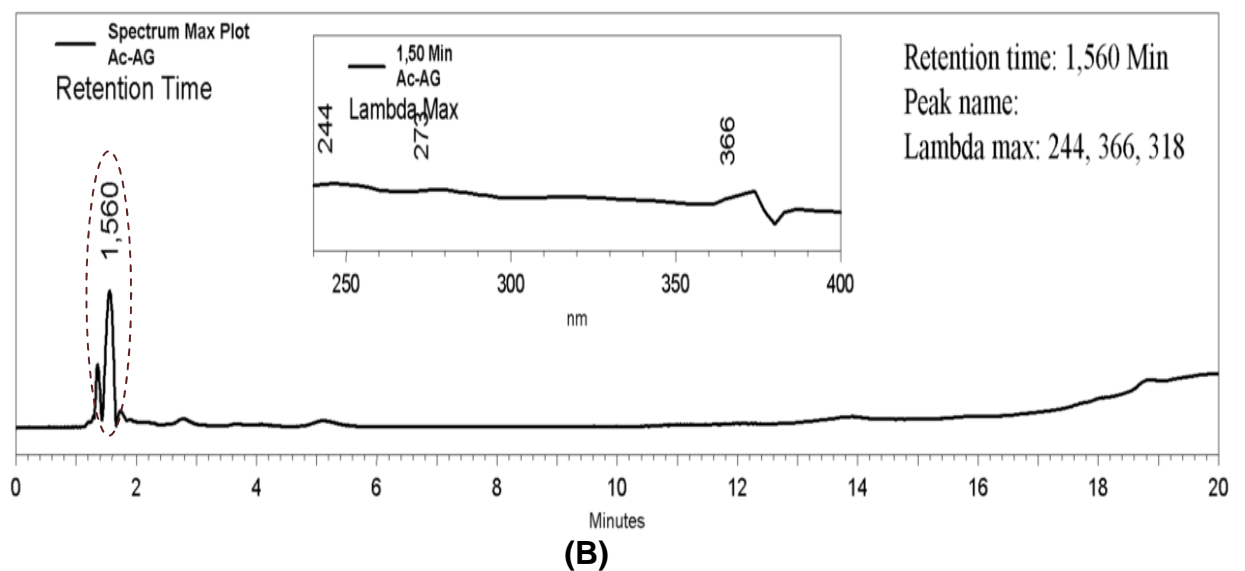
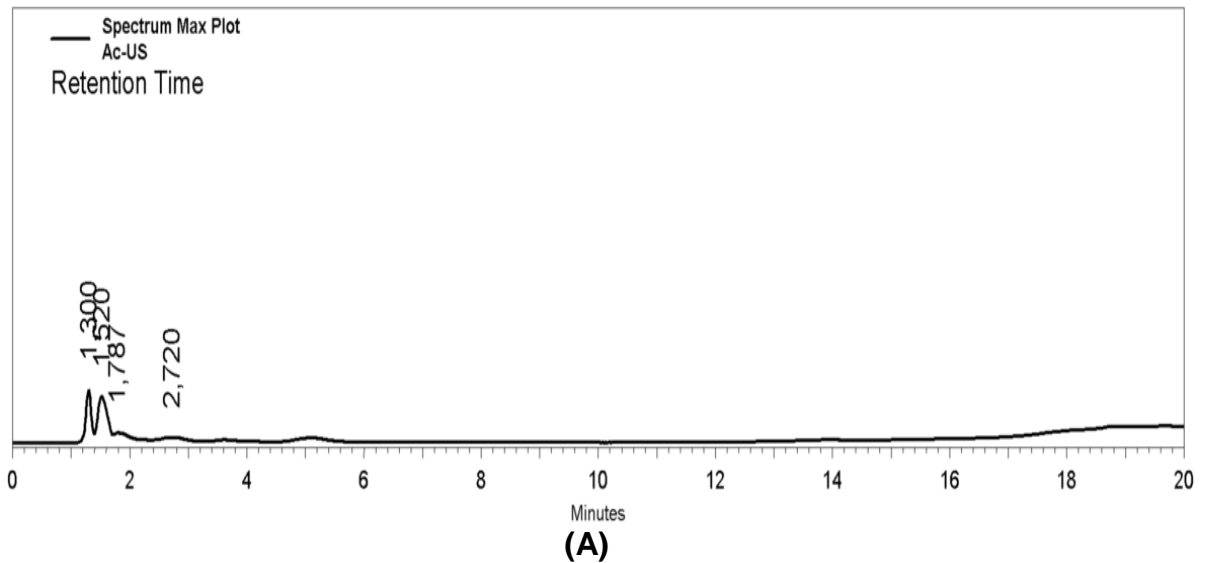


Figura 32. Cromatogramas por CLAE del extracto acuoso de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) obtenido por: **(A)** Ultrasonido (Ac-US) y **(B)** Agitación magnética (Ac-AG)

Como se aprecia en los cromatogramas de los extractos butanólicos obtenidos por ultrasonido y agitación magnética (Ver figuras 31 **A** y **B**), en ambos se encontró un pico de tiempo de retención de 5,1 minutos que corresponde a teofilina por comparación con el tiempo del estándar y su ausencia en los extractos acuosos (Ver figura 32 **A** y **B**) indica que se logró la retención de este alcaloide en el extracto butánolico.

Se recomienda evaluar la actividad biológica del extracto butanólico y acuoso puesto que por recursos no fue posible concluir este tipo de análisis en los extractos.

Tanto en los perfiles cromatográficos de los extractos acuosos como en los perfiles butanólicos y en acetato de etilo se encontraron 4 picos con tiempo de retención entre 1,3 y 3,6 minutos. Estos picos se concentraron en el extracto acuoso ya que pueden estar glicosidados como lo reportan otros autores, [100, 101, 102, 103 y 104], lo que les confiere mayor polaridad y dificulta su extracción en otros solventes, esto puede incidir en la baja concentración de fenoles en los extractos en acetato de etilo.

Se propone mejorar la extracción para próximos estudios haciendo una retención selectiva de los alcaloides como por ejemplo extracción en fase sólida, [105], para analizar los otros componentes (tales como fenoles) con mayor facilidad, como el caso del extracto acuoso **Ac-AG** (Ver figura 32 **B**) que presenta un pico bien definido con un tiempo de retención de 1,56 minutos que es común a los cromatogramas de los extractos en acetato de etilo, butánolico y acuosos, siendo en este último de mayor concentración por su afinidad en solventes altamente polares, que corresponde posiblemente a compuestos de tipo fenólico.

Adicionalmente se sugiere realizar un análisis químico más detallado del extracto acuoso empleando estándares y haciendo hidrólisis ácida o enzimática puesto que allí hay presentes fenoles glicosidados (Ver figura 33) como isoquercitrina (quercetina 3-O-glucósido), hiperosida (quercetina 3-O-galactosido), [37], entre otros, puesto que el análisis que se realizó al extracto acuoso no estaba dentro de los objetivos fijados en el desarrollo del presente trabajo.

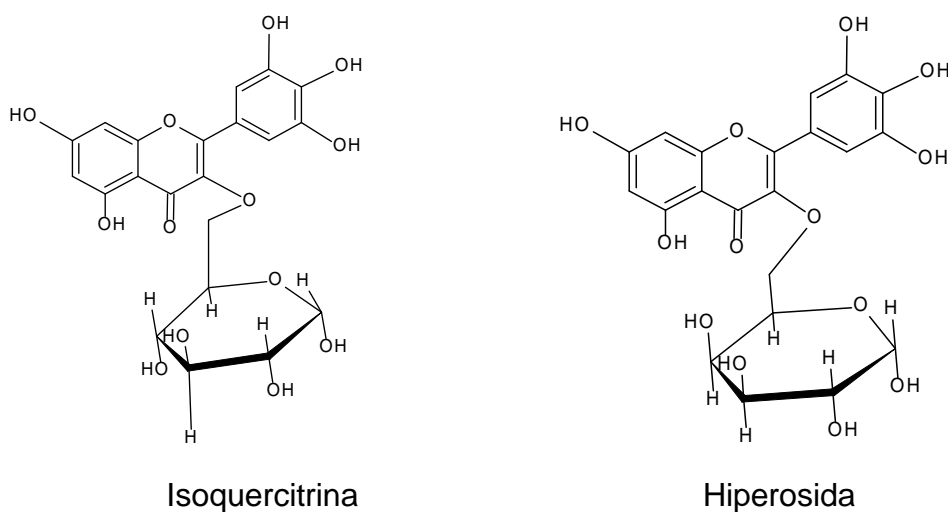


Figura 33. Fenoles glicosidados en cacao

7.5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

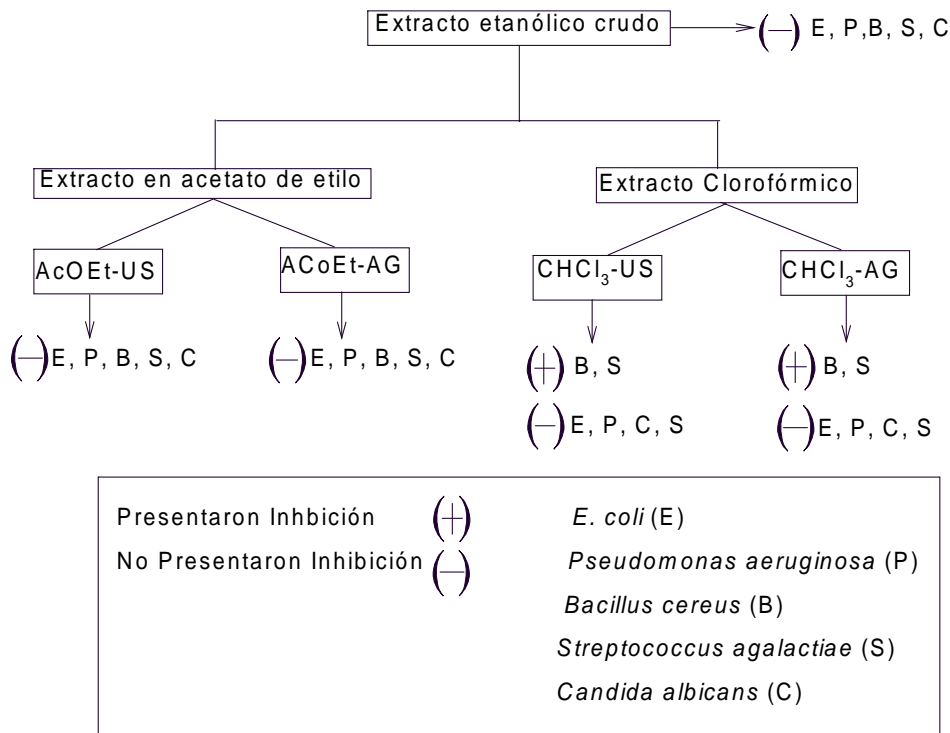


Figura 34. Esquema de la actividad antibacteriana de los extractos clorofórmicos y en acetato de etilo de cáscara de cacao

La figura 34 esquematiza los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de los extractos clorofórmicos y en acetato de etilo de cáscara de cacao frente a las diferentes cepas utilizadas de bacterias gram negativas, gram positivas y frente al hongo.

Los extractos clorofórmicos procedentes de las extracciones por ultrasonido (**CHCl₃-US**) y agitación magnética (**CHCl₃-AG**) presentaron actividad antibacteriana frente a los microorganismos *B. cereus* (Ver figuras 35 y 36) y *S. agalactiae* (Ver figuras 37 y 38). En el análisis se empleó como blanco dimetilsulfóxido (DMSO) cuya función fue como solvente de los extractos y como se aprecia en las figuras mencionadas anteriormente no presenta actividad biológica frente a los microorganismos evaluados. El porcentaje de inhibición logrado frente a *B. cereus* fue de 34.90% con el extracto CHCl₃-AG (Ver figura 39) empleando una concentración de 100 µg/µL y de 33.33% con el extracto CHCl₃-US evaluado a la misma concentración, siendo evidente que no hay una diferencia importante entre éstos extractos. Según el análisis químico, estos extractos clorofórmicos se encuentran enriquecidos en cafeína, teofilina y teobromina presentes en mayor concentración en el extracto CHCl₃-AG,

sin embargo en este caso la diferencia en concentraciones no influyó significativamente en su actividad.

Con relación a la actividad de los extractos clorofórmicos frente a *S. agalactiae* como se aprecia en la figura 40, el extracto CHCl₃-AG presentó un porcentaje de inhibición del 52.40% (100 µg/µL) considerablemente mayor que el obtenido con el extracto CHCl₃-US que fue del 34.90% (100 µg/µL) indicando que en éste caso la diferencia en concentración de los alcaloides presentes si incide en su actividad.

Este mismo comportamiento se verifica con la inhibición del crecimiento del mismo microorganismo empleando una concentración menor de los extractos (50 µg/µL), obteniéndose una inhibición del 47.80% con el extracto CHCl₃-AG y del 28.60% con el extracto CHCl₃-US. Es importante resaltar que no hay una gran diferencia entre la actividad del extracto CHCl₃-AG de concentración de 100 µg/µL y la de 50 µg/µL, abriendo la posibilidad de emplear bajas cantidades del extracto. Para la misma efectividad sería necesario hacer un estudio más detallado de las concentraciones del extracto y su actividad frente a este microorganismo que permita establecer el rango de concentración adecuado.

Es posible que los extractos clorofórmicos (CHCl₃-AG y CHCl₃-US) hayan presentado mayor inhibición sobre el crecimiento de *S. agalactiae* con relación a *B. cereus* debido a que el primer microorganismo al ser aislado no ha tenido contacto con antibióticos lo que permite que sea más “sensible” al ser evaluado frente a sustancias antimicrobianas. Según el análisis químico, éstos extractos están enriquecidos en los alcaloides anteriormente mencionados, por lo tanto la concentración de los mismos puede ser diferente en los extractos clorofórmicos y debido a ello hay una diferencia significativa en los porcentajes de inhibición frente a *Streptococcus agalactiae* aunque su composición química permanezca constante.

Estos extractos no generaron inhibición frente a las otras cepas de microorganismos utilizadas para el análisis (*E. coli* aislada de pollo, *P. aeruginosa* y *C. albicans*), entre otros factores esto se debe a que posiblemente los alcaloides allí presentes no desarrollaron ningún mecanismo de bloqueo sobre los microorganismos gram-negativos.

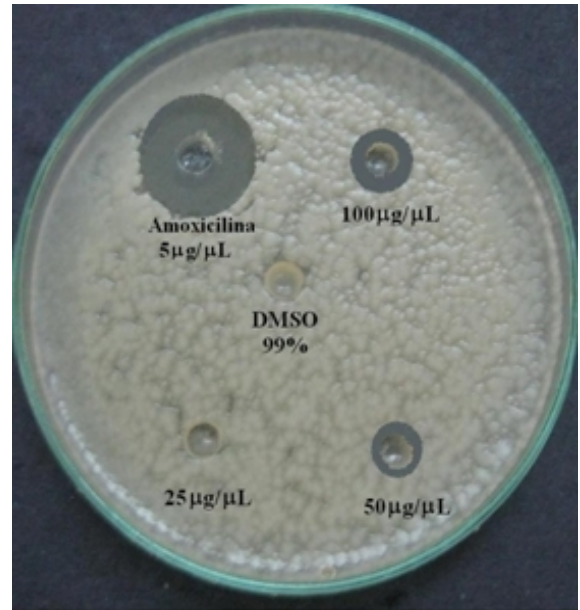
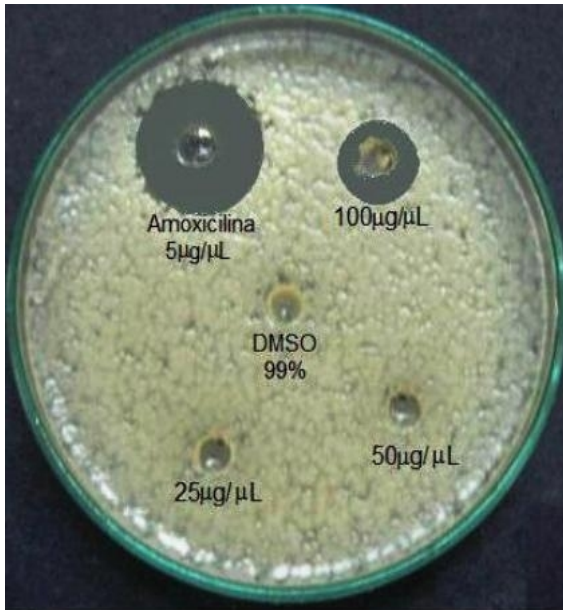


Figura 35. Inhibición CHCl₃-US Vs *B. cereus* **Figura 36.** Inhibición CHCl₃-AG Vs *B. cereus*

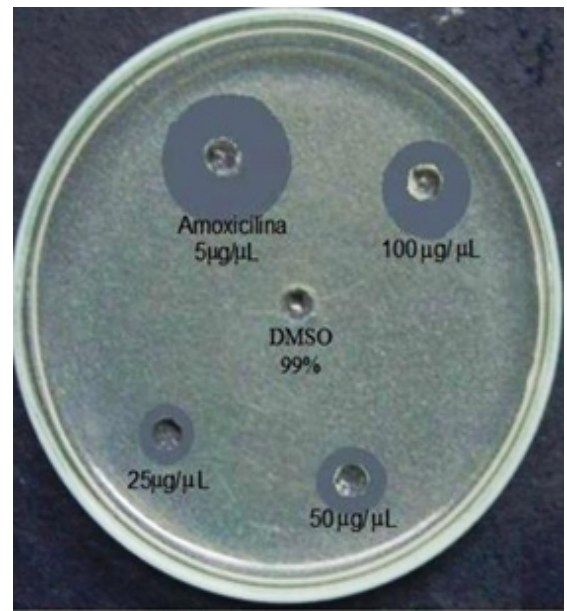
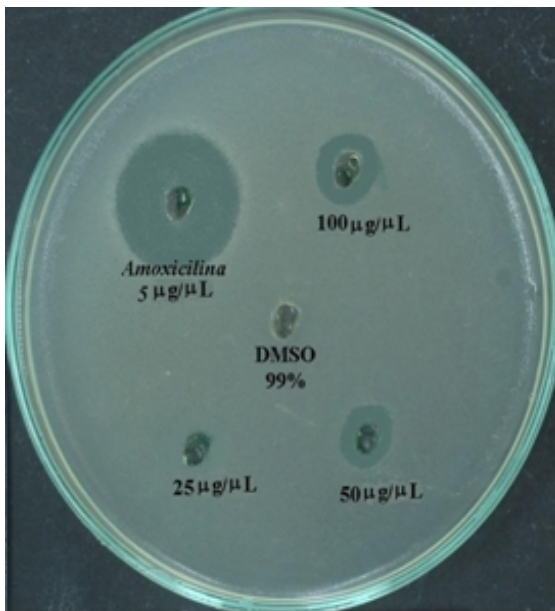


Figura 37. Inhibición CHCl₃-US Vs *S. agalactiae* **Figura 38.** Inhibición CHCl₃-AG Vs *S. agalactiae*

Para *Pseudomonas aeruginosa* el resultado no fue bactericida sino bacteriostático, es decir, se inhibió el crecimiento pero no se produjo la muerte, debido posiblemente a la baja concentración de los componentes que pudieran tener actividad. Este resultado también puede explicarse con base en lo reportado en la literatura, [106], en donde se recomienda que para el tratamiento de esta bacteria se debe emplear más de un fármaco antimicrobiano. Debido al efecto mencionado sobre la cepa de *P. aeruginosa* por parte de los extractos utilizados (EXTUS, EXTAG, CHCl₃-US, CHCl₃-AG, AcOEt-US, AcOEt-AG) se sugiere que en posteriores investigaciones se estudie dicho resultado para indagar las posibles causas y responsables de este efecto bacteriostático puesto que aunque es sobresaliente por tratarse de un extracto de un desecho agroindustrial que no había sido evaluado, no hace parte de los objetivos establecidos de este trabajo que se enfoca en encontrar efectos bactericidas de los extractos evaluados.

Los extractos en acetato de etilo (**AcOEt-US** y **AcOEt-AG**) no presentaron ningún efecto bactericida sobre las bacterias que fueron objeto de estudio (*E. coli* aislada de pollo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus agalactiae*). Esto hecho podría explicarse con base en la baja concentración de compuestos fenólicos en los extractos evaluados, los cuales han demostrado tener actividad antibacteriana en otros estudios, [39 y 107] y adicionalmente se apreció en el análisis composicional de las diferentes fracciones (extractos en acetato de etilo) que estos se encuentran glicosidados lo que probablemente interfiere para que exhiban su actividad biológica. Así mismo se esperó encontrar actividad por parte los extractos etanólicos crudos (**EXTUS** y **EXTAG**) porque ellos contenían tanto los alcaloides identificados como fenoles de los cuales se esperaba que generaran inhibición frente a los microorganismos evaluados de forma individual o sinérgica pero no se obtuvieron resultados satisfactorios. Una posible explicación de este hecho radica en que los componentes que tuvieron actividad antibacteriana (teobromina, cafeína y teofilina individual ó sinérgicamente) estaban en muy baja concentración por lo que no se observó ninguna actividad. Con base en la composición química de estos extractos y de acuerdo a los ensayos realizados por otros autores, [66], quienes al disminuir la cantidad de inóculo utilizada inicialmente (100 µL), observaron que aumentó la “sensibilidad” aparente del microorganismo que estaba siendo objeto de análisis, por lo cual se sugiere que en próximos estudios se realice dicha modificación para evaluar la actividad biológica de los extractos etanólicos crudos y en acetato de etilo.

Ninguno de los extractos evaluados (EXTUS, EXTAG, CHCl₃-US, CHCl₃-AG, AcOEt-US, AcOEt-AG) exhibió actividad frente a *Candida albicans*. Según estudios previos, [66, 108 y 109], los fenoles (como ácido gálico ó elágico) se han reportado con actividad inhibitoria de proteasa aspártica secretoria de *C. albicans*. Sin embargo los extractos AcOEt-US y AcOEt-AG de los que se esperaba que los compuestos fenólicos presentaran actividad no hubo un resultado positivo.

Este hecho puede atribuirse principalmente a dos factores que son la baja concentración de fenoles en los extractos y/o a que los fenoles estaban glicosidados lo que impedía que tuvieran acción inhibitoria contundente sobre este hongo. Se sugiere hacer una hidrólisis (ácida o enzimática) previa para luego extraer con acetato de etilo los fenoles libres de azúcares y evaluar la actividad biológica de este extracto nuevamente.

Finalmente, *E. coli* aislada de pollo presentó resistencia frente a los extractos empleados (EXTUS, EXTAG, CHCl₃-US, CHCl₃-AG, AcOEt-US, AcOEt-AG), esto puede atribuirse a que la gallina de la cual se aisló la cepa pudo haber estado en contacto durante su crecimiento con antibióticos lo que generó la resistencia. Los genes de resistencia se adquieren probablemente a través de un proceso de intercambio genético en donde se altera una vía metabólica que bloquea el agente antimicrobiano ó debido a la impermeabilidad al antibiótico y/o a que el organismo sea capaz de bombear hacia fuera el antibiótico que va entrando a la célula por eflujo, [106].

Los porcentajes de inhibición arrojados por los extractos clorofórmicos frente a las bacterias susceptibles (*B. cereus* y *S. agalactiae*) se pueden considerar muy buenos en comparación a otros estudios, donde se reportan porcentajes del 63.30% (100 µg/µL) y 55.20% (50 µg/µL) de extractos n-butanólicos de *Miconia aeruginosa Naudin* frente a *E. coli* ATCC 13706, [64]. Así mismo, el extracto en acetona acuosa de *Miconia coronata* contra *E. coli* aislada de pollo presentó porcentajes de inhibición de 52.7% (100 µg/µL) y 47.1% (50 µg/µL), [110]. La fracción hidrolizada del extracto en isopropanol-agua de *Tibouchina multiflora* generó un porcentaje de 55.7% (100 µg/µL) contra *Candida albicans*, [66], y el extracto en acetato de etilo de *Diplosteghium tolimense Cuatrec* reportó un porcentaje de 38.2% (80 µg/µL) frente a *S. aureus*, [111]. Con base en los porcentajes de inhibición encontrados en el presente trabajo y comparándolos con los reportados por otros estudios frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas, se considera que los extractos clorofórmicos de cáscara de cacao (*Theobroma cacao L*), son promisorios como una fuente de componentes antibacteriales que de paso generaría otro potencial uso de este desecho agroindustrial.

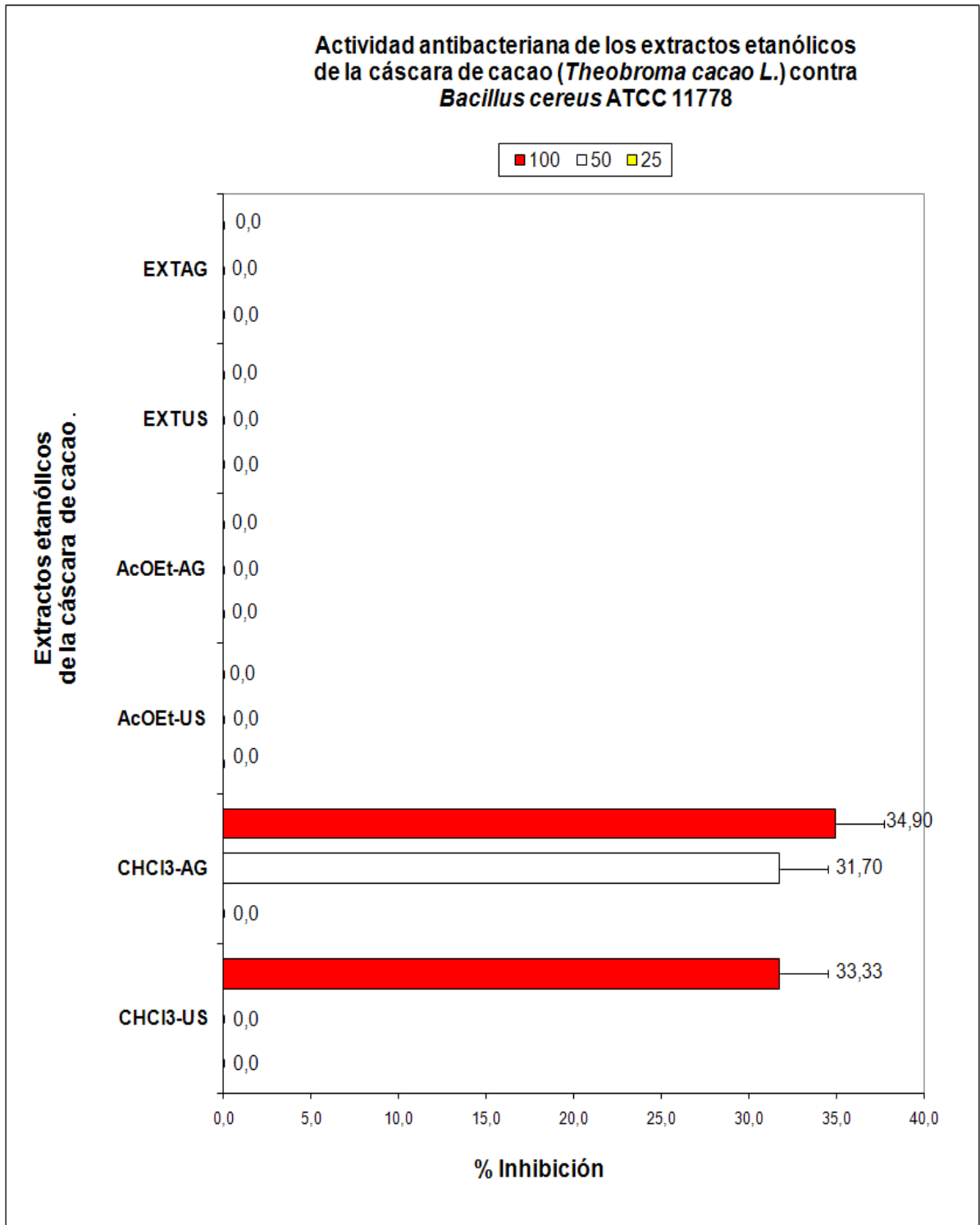


Figura 39. Porcentaje de inhibición frente a *B. cereus*

Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de la cáscara de cacao (*Theobroma cacao L.*) contra *Streptococcus agalactiae*, aislado en el Laboratorio Clínico López Correa, Pereira (Colombia)

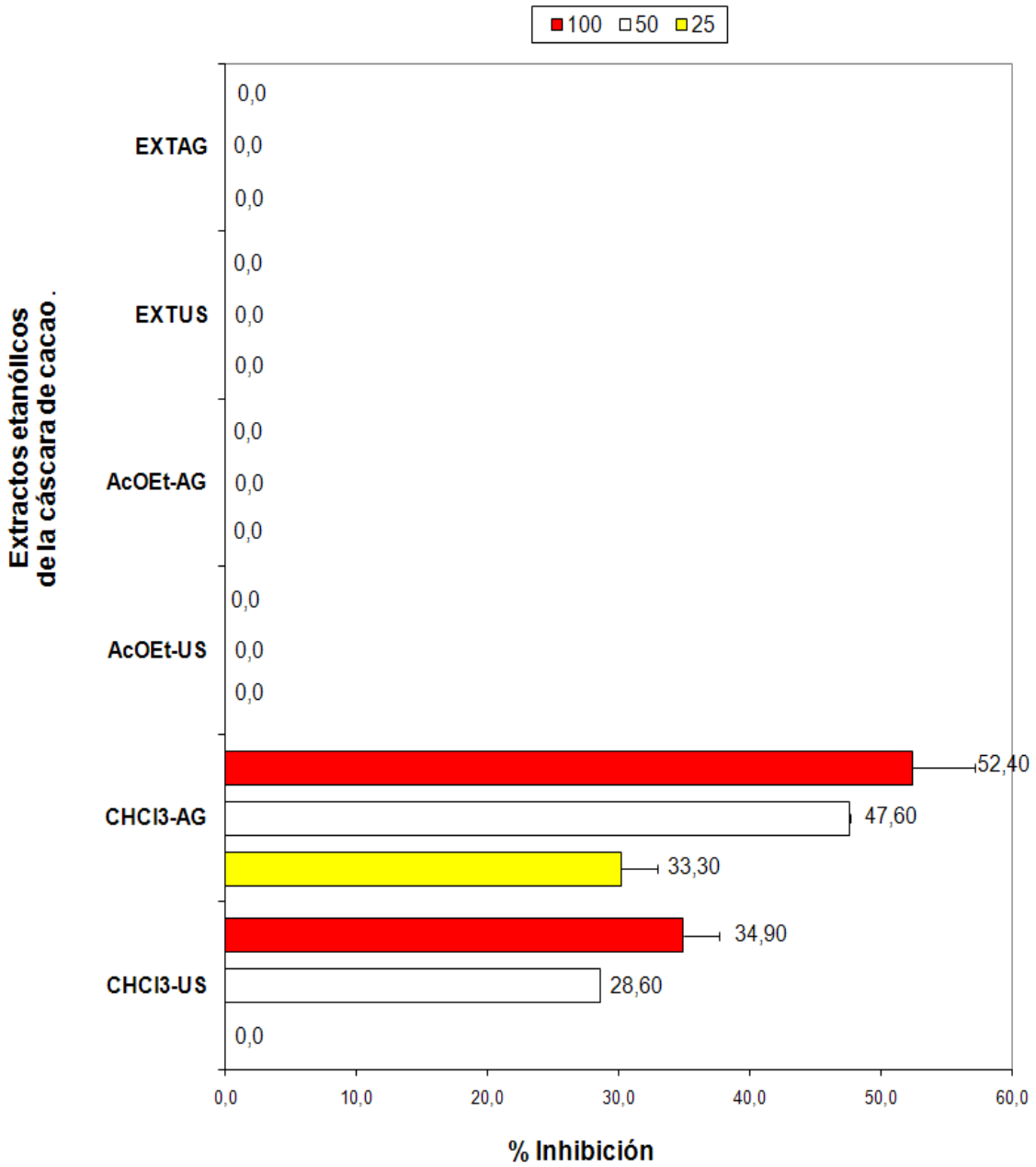


Figura 40. Porcentaje de inhibición frente a *S. agalactiae*

7.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos clorofórmicos (CHCl₃-US y CHCl₃-AG)

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto CHCl₃-US fue de 1024 µg/ml y para CHCl₃-AG de 512 µg/ml frente a *B. cereus* (Ver figura 41). Para el caso de *Streptococcus agalactiae*, ambos extractos (CHCl₃-US y CHCl₃-AG) inhibieron el crecimiento de *S. agalactiae* con una CMI de 128 µg/ml (Ver figura 42), apreciándose que esta bacteria es más sensible que *B. cereus* al momento de ser evaluada su capacidad para reproducirse cuando hay presentes componentes antimicrobianos en su medio.

Según Aligiannis y sus colegas griegos de la Universidad de Atenas, [112], propusieron una clasificación de extractos vegetales basada en los resultados de la CMI así:

Inhibidores Fuertes: CMI menor de 500 µg/ml; Inhibidores Moderados: CMI entre 600 a 1500 µg/ml; Inhibidores Débiles: CMI mayor de 1600 µg/ml. Según esto, los extractos clorofórmicos (**CHCl₃-US y CHCl₃-AG**) de cáscara de cacao pueden ser considerados potentes inhibidores de *B. cereus* y *S. agalactiae*, puesto que inhiben estos microorganismos con valores de CMI < 500 µg/ml. Los resultados de la CMI encontrados en este estudio son bastante buenos en comparación a otros estudios, donde reportan CMI comprendidos entre 100 a 500 µg/ml por aceites esenciales de hojas de plantas brasileñas contra diferentes serotipos de *E. coli*, [112], además los extractos crudos de las raíces de *Polygonum cuspidatum* presentan valores de CMI de 312.5 µg/ml frente a *B. cereus* y *S. aureus*, así mismo un valor CMI de 156.3 µg/ml frente a *L. monocytogenes*, [113], el extracto en acetato de etilo de *Miconia coronata* contra *P. aeruginosa* registra un valor de 1024 µg/ml para la CMI, [93], y el extracto etanólico de la raíz de *Hermannia depressa* arrojó un valor de CMI de 195 µg/ml frente a *B. subtilis*, [114].

Con base en los valores de CMI arrojados por los extractos clorofórmicos y comparándolos con los reportados por estudios frente a diferentes microorganismos se puede concluir que dichos extractos provenientes de cáscara de cacao son promisorios puesto que inhiben a los microorganismos en cuestión (*B. cereus* y *S. agalactiae*) con una concentración mínima por lo que se sugiere realizar estudios para observar la viabilidad de que sean utilizados como complemento y/o de forma conjunta con otros agentes antimicrobianos usados para inhibir el crecimiento de las bacterias mencionadas.

La inhibición del crecimiento de los microorganismos gram-positivos *Bacillus cereus* y *Streptococcus agalactiae* mediante el método de difusión en agar por parte de los extractos clorofórmicos (CHCl₃-US y CHCl₃-AG) puede atribuirse a la presencia de uno de los alcaloides identificados en el análisis químico tal como teobromina, cafeína y teofilina ó al efecto sinérgico entre ellos. Según el análisis

químico es posible que la teobromina en conjunto con la teofilina generaran efectos mutagénicos y genotóxicos sobre las bacterias mencionadas, con base en estudios hechos por otros autores con estos alcaloides, [115 y 116]. Así mismo la cafeína combinada con la teobromina pudo generar efectos genotóxicos sobre las bacterias que fueron sensibles, de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores empleando estas metilxantinas, [117 y 118].

Se propone que para próximos estudios se evalúe la actividad antibacteriana frente a estas mismas bacterias (*B. cereus* y *S. agalactiae*) empleando estándares de teobromina, cafeína y teofilina de forma individual y en mezcla para dar con el responsable de dicha actividad.

El hecho de que los extractos clorofórmicos de un residuo agroindustrial como lo es la cáscara de cacao obtenida después del proceso de tostado en la producción de chocolate posea actividad antibacteriana resulta ser un avance importante para la agroindustria del cacao en Colombia y su aprovechamiento integral, ya que éste es el primer reporte hasta la fecha conocido en el país sobre dicha actividad biológica *in vitro*.

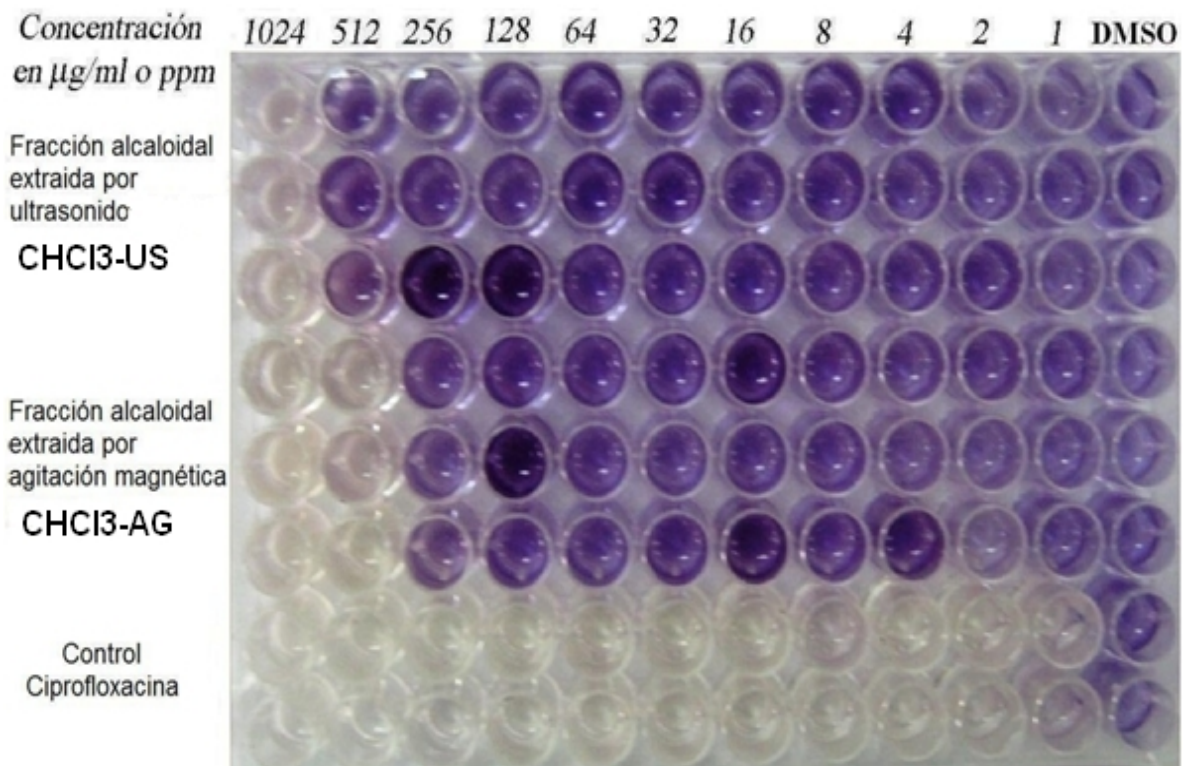


Figura 41. CMI de los extractos CHCl₃-US y CHCl₃-AG frente *B. cereus*

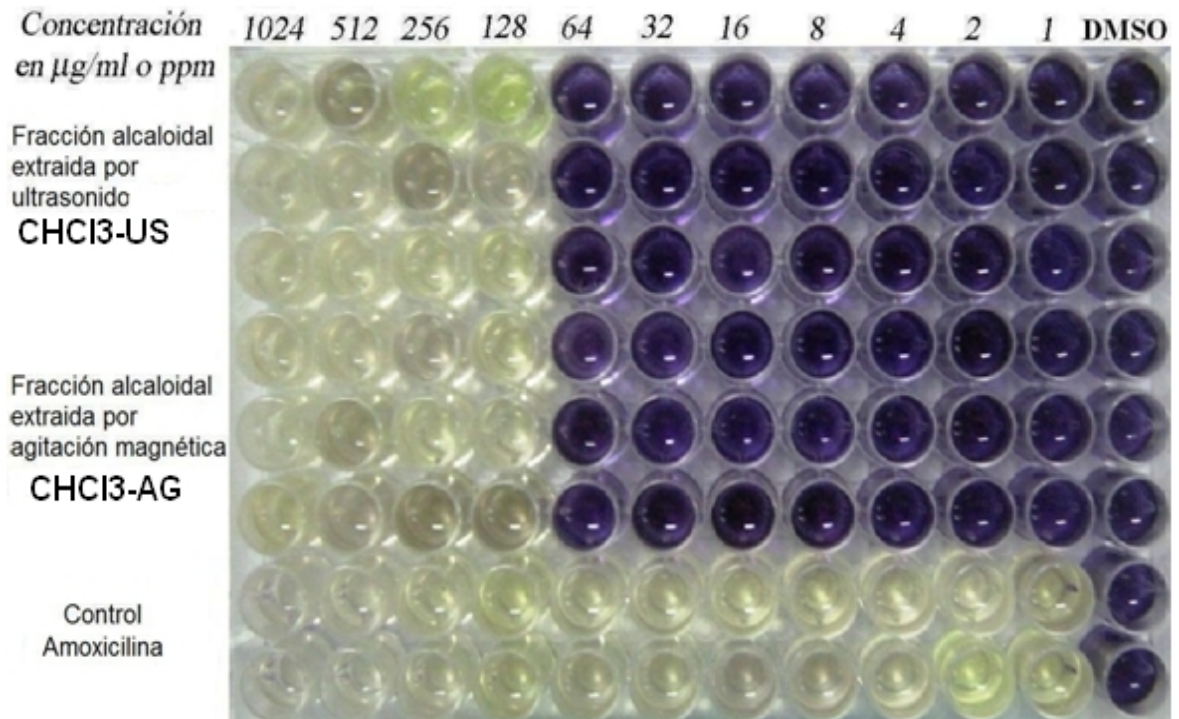


Figura 42. CMI de los extractos CHCl₃-US y CHCl₃-AG frente *S. agalactiae*

Debido a que los extractos están enriquecidos en alcaloides (teobromina, cafeína y teofilina) y se encuentran presentes en forma natural en los productos alimenticios como chocolate, café, té y cola, se sugiere realizar estudios posteriores para evaluar la viabilidad de emplear éstos extractos como parte de los agentes químicos conservantes (tales como ácido benzoico, compuestos sulfitados y vainillina) utilizados para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria, [119 y 120]. También se recomienda para próximas investigaciones que se hagan estudios para evaluar la posibilidad de emplear los extractos en combinación con otros agentes antimicrobianos con fines industriales en el área microbiológica debido a su efecto bactericida. Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana y de la concentración mínima inhibitoria de los extractos indican que tienen un gran alcance para eliminar el crecimiento de una de las bacterias que causan intoxicaciones alimentarias (*Bacillus cereus*) e inhibir el crecimiento de uno de los microorganismo que causan severas complicaciones mujeres gestantes y puérperas como corioamnionitis y endometritis postparto (*Streptococcus agalactiae*), por lo tanto se recomienda que desarrollen investigaciones en donde se analice la viabilidad de utilizar los extractos en el tratamiento de éstas infecciones.

Los datos correspondientes a la actividad antibacterial evaluada frente a cada una de las cepas se encuentran en las tablas ubicadas en los anexos 15 a 24.

CONCLUSIONES

- ✓ Se encontró que la concentración de fenoles totales mediante el método de Folin – Ciocalteu en los extractos en acetato de etilo de cáscara de cacao fue de 111.38 ± 1.41 mg / g extracto y 91.64 ± 1.30 mg / g extracto para los métodos de extracción por ultrasonido y agitación magnética respectivamente.
- ✓ Mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se identificó y cuantificó cafeína en los extractos clorofórmicos (**CHCl₃-US** y **CHCl₃-AG**) con valores de 7.77 y 10.31 mg/L. Igualmente se identificó teofilina pero no fue posible su cuantificación debido a que hubo un reparto de la misma durante el procedimiento de fraccionamiento entre los extractos en acetato de etilo y butánolico estudiados.
- ✓ De acuerdo a los resultados obtenidos por CLAE, la teofilina es el principal alcaloide en cáscara de cacao.
- ✓ Según el contenido de alcaloides en el extracto CHCl₃-US comparado con lo encontrado en el CHCl₃-AG, la extracción fue más eficiente por agitación magnética que por ultrasonido, apreciándose en mayor concentración los componentes de acuerdo con el análisis químico realizado por CLAE.
- ✓ Se identificó cafeína en los extractos clorofórmicos de cáscara de cacao mediante cromatografía de gases / espectrometría de masas.
- ✓ Los extractos clorofórmicos obtenidos por agitación magnética (**CHCl₃-AG**) y ultrasonido (**CHCl₃-US**) evaluados frente a *Bacillus cereus* presentaron un significativo porcentaje de inhibición respecto al control (amoxicilina de 5 µg/µL) con valor de 34.90% (100 µg/µL) y 33.33% (100 µg/µL) respectivamente.
- ✓ El microorganismo aislado en el Laboratorio López Correa: *Streptococcus agalactiae*, fue mucho más “sensible” frente a los extractos clorofórmicos **CHCl₃-AG** y **CHCl₃-US** que tuvieron la capacidad de inhibir su crecimiento respecto al control (amoxicilina de 5 µg/µL) en un 52.40% (100 µg/µL) y 34.90% (100 µg/µL) respectivamente.
- ✓ La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto **CHCl₃-US** fue de 1024 µg/ml y para **CHCl₃-AG** de 512 µg/ml frente a *Bacillus cereus*. Sin embargo ambos extractos clorofórmicos inhibieron el crecimiento de *S. agalactiae* con una CMI de 128 µg/ml.

- ✓ La inhibición del crecimiento de los microorganismos gram positivos *Bacillus cereus* y *Streptococcus agalactiae* mediante el método de difusión en agar por parte de los extractos clorofórmicos (**CHCl₃-US** y **CHCl₃-AG**) puede atribuirse a la presencia de uno de los alcaloides identificados en el análisis químico tales como teobromina, cafeína y teofilina ó al efecto sinérgico entre ellos.
- ✓ Los extractos clorofórmicos de la cáscara de cacao son una fuente de alcaloides con actividad biológica que podrían ser utilizados en combinación con otros agentes antimicrobianos con fines industriales en el área microbiológica debido a su efecto bactericida.
- ✓ Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana y de la concentración mínima inhibitoria de los extractos indican que tienen un gran potencial para disminuir el crecimiento de una de las bacterias que causan intoxicaciones alimentarias (*Bacillus cereus*) e inhibir el crecimiento de uno de los microorganismos que causan complicaciones severas en mujeres gestantes y puérperas (*Streptococcus agalactiae*).
- ✓ Este trabajo de investigación es el primer reporte hasta la fecha conocido en el país sobre actividad antibacteriana *in vitro* de cáscara de cacao, lo que resulta ser un avance importante para la agroindustria del cacao en Colombia y su aprovechamiento integral.

RECOMENDACIONES

- Mejorar la limpieza realizada con hexano a la cáscara de cacao con el fin de obtener en este procedimiento preliminar la mayor cantidad posible de ácidos grasos, pigmentos, lípidos y cualquier tipo de compuestos que fuesen interferentes para el análisis del extracto polar y sus fracciones.
- Mejorar la extracción de alcaloides haciendo una retención selectiva de los mismos con el fin de analizarlos sin la presencia de interferentes.
- Evaluar la actividad biológica y emplear el método de Folin – Ciocalteu con el objetivo de determinar el contenido de fenoles totales en los extractos butánolico y acuoso para complementar el análisis.
- Realizar bioensayos mediante el método de difusión en agar empleando estándares de teobromina, cafeína y teofilina con el fin de determinar el responsable de la actividad antibacteriana y comparar esos resultados con los obtenidos en esta investigación frente a *B. cereus* y *S. agalactiae*.
- Emplear otros microorganismos para hacer bioensayos mediante el método utilizado en este trabajo con el propósito de evaluar el espectro de actividad biológica que poseen los extractos clorofórmicos de cáscara de cacao (*Theobroma cacao* L.).
- Hidrolizar la fase acuosa lograda luego de la extracción con cloroformo con el fin de obtener fenoles libres para determinar su contenido total y comparar los resultados con los reportados para el presente trabajo. Así mismo mejorar las condiciones cromatográficas por CLAE de separación con el fin de identificar los posibles compuestos fenólicos presentes en los extractos en acetato de etilo, butánolico y acuoso empleando estándares de fenoles como catequina, epicatequina, quercetina, isoquercitrina, hiperosida, entre otros.

BIBLIOGRAFIA

- [1] MARTÍNEZ COVALEDA, Héctor; HERMIDA ORTÍZ, Lila. La Cadena de cacao en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. Observatorio Agro – Cadenas. 58 (2005) 2 – 49.
- [2] QUINTERO, María Liliana; DÍAZ MORALES, Katty Marisabel. El mercado mundial de cacao. Caracas, Venezuela. Agroalimentaria. 18 (2004) 47 – 59.
- [3] COE, Sophie; COE, Michael. The True History of Chocolate. New York. Thames and Hudson Ltd. Segunda Edición. (1996) 16 – 103.
- [4] WOLLGAST, Jan.; ANKLAM, Elken. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? Food Research International. 33 (2000b) 449 – 459.
- [5] DOS SANTOS DIAS, Luiz Antonio. Genetic Improvement of Cacao. Food and agriculture organization of the United Nations, FAO. (2001) 7 – 40.
- [6] KELISHADI, Roya. Cacao to cocoa to chocolate: healthy food?. ARYA Journal. 1 (2005) 28 – 33.
- [7] WILLIAMSON, Jhon; WYANDT, Christy. Herbal therapies: The Facts and the Fiction. Drug Topics. 7 (1997) 34 – 41.
- [8] ¿Chocoterapia: una moda o una terapia con grandes propiedades y beneficios? Disponible: <http://terapias.typepad.com/terapiasmanuales/2008/03/chocoterapia-un.html#more> (6 Aug. 2008).
- [9] Informe: La cosmética formulada con alimentos. Disponible: <http://www.estetica-natural.com/articulos/alimentoscsmeticos.php> (6 Aug. 2008).
- [10] Materias Primas: Productos para aromaterapia y cosmética, Manteca de Cacao. Disponible: <http://www.apsaravital.com/productos/materias-primas.html> (6 Aug. 2008).
- [11] Industria del Cacao. Disponible: <http://www.bluer.es/Aplicaciones/Cacao.htm> (6 Aug. 2008).
- [12] IX. LÍPIDOS, Manteca de Cacao. Disponible: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/ap/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/ap_bot-farm2c/montesm02/18.html (6 Aug. 2008).
- [13] Plantas Medicinales: El Cacao. Disponible: <http://www.botanical-online.com/cacao.htm> (29 Sep. 2008).

- [14] MOYIN JESU, Emmanuel. Use of plant residues for improving soil fertility, pod nutrients, root growth and pod weight of okra (*Abelmoschus esculentum* L). *Bioresource Technology*. 98 (2007) 2057 – 2064.
- [15] MOLLEA, C; CHIAMPO, F; CONTI, R. Extraction and characterization of pectins from cocoa husks: A preliminary study. *Food Chemistry*. 107 (2008) 1353 – 1356.
- [16] BARAZARTE, Humberto; SANGRONIS, Elba; UNAI, Emaldi. La cascara de cacao (*theobroma cacao* L.): una posible fuente comercial de pectinas. Caracas, Venezuela: *Archivos latinoamericanos de nutrición*. 58 (2008) 64 – 69.
- [17] POUOMOGNE, Víctor; TAKAM, Gabriel; POUEMEGNE, Jean Bosco. A preliminary evaluation of cacao husks in practical diets for juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 156 (1997) 211 – 219.
- [18] PADRÓN GAMBOA, Gabriela; ARIAS MARÍN, Eduardo Manuel; ROMERO GARCÍA, Jorge; BENAVIDES MENDOZA, Adalberto; ZAMORA RODRÍGUEZ, Josefina; GARCÍA RODRÍGUEZ, Sandra Peregrina. Efecto de la cáscara de cacao en la obtención de espumas de poliuretano para uso hortícola: Propiedades físicas y de biodegradabilidad. México. *Revista Sociedad Química*. 48 (2004) 156 – 164.
- [19] Agenda Interna de Risaralda para la productividad y la competitividad. Eje cafetero. Apuesta Cacao, maderables, oleaginosas y caucho. Risaralda, Colombia. Centro de investigaciones socioeconómicas de Risaralda, CIR. (2005) 233 – 240.
- [20] MARTÍNEZ COVALEDA, Héctor; HERMIDA ORTÍZ, Lila. BELTRÁN LAMMOGLIA, Luz Stella. La Cadena de cacao en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. *Observatorio Agro – Cadenas*. 92 (2005) 41 – 53.
- [21] KALVATCHEV, Zlatko; GARZARO, Domingo; GUERRA, Franklin. *Theobroma Cacao* L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud. Caracas, Venezuela. *Agroalimentaria*. 6 (1998) 23 – 24.
- [22] OSEI, S; ATUAHENE, C; HEATHCOTE, D; FRIMPONG, E; ADOMAKO, D. Cocoa pod and husk meal as a feed ingredient in layer diets. *Animal Feed Science and Technology*. 35 (1991) 283 – 288.
- [23] DONKOH, A; ATUAHENE, C; WILSON, B; ADOMAKO, D. Chemical composition of cocoa pod husk and its effect on growth and food efficiency in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*. 35 (1991) 161 – 169.

[24] OOSHIMA, T; OSAKA, Y; SASAKI, H; OSAWA, K; YASUDA, H; MATSUMURA, M. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in *in-vitro* and animal experiments. Archives Oral Biology. 45 (2000) 639 – 645.

[25] Familia Sterculiaceae: Géneros. Disponible: <http://www.arbolesornamentas.com/Sterculiaceae.htm> (29 Sep. 2008)

[26] SALAMANCA GROSSO, Guillermo; PÉREZ FIGUEREDO, Carmen; ZAPATA RIVERA, María; OSORIO TANGARIFE, Mónica. Flora Apícola indicadora Departamento del Tolima. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Tolima. (2004) 6 – 11.

[27] Cacao. Disponible: <http://www.yacambuquibor.infoagro.info.ve/cultivos/cacao>. (29 Sep. 2008)

[28] PAREDES ARCE, Mendis. Manual del cultivo del cacao. Programa para el desarrollo de la amazonia. Ministerio de agricultura. Proamazonia. Perú. (2004) 9 – 66.

[29] Theobroma (Genus). Disponible: http://www.zipcodezoo/Key/Plantae/Theobroma_Genus.asp (30 Sep. 2008)

[30] YA TANG. Theobroma in Flora of China. Disponible: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=132784 (30 Sep 2008)

[31] MARTÍNEZ COVALEDA, Héctor; BELTRÁN LAMMOGLIA, Luz Stella. La industria de chocolates en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia. Observatorio Agro – Cadenas. 76 (2005) 1 – 56.

[32] ¿Cuál es la composición (física y química) de los granos, de la manteca, de la masa y del polvo de cacao? Disponible: <http://www.food-info.net/es/qa/qa-fp48.htm> (6 Aug. 2008).

[33] PIANO PALOMO, José Aldo; GARRIDO JIMÉNEZ, Luis Fernando; BAREA ARANDA, José Antonio; GUIJARRO MEDIANERO, Francisco Javier. El Chocolate y las Grasas. Grupo de trabajo “QUIMESCA”. Málaga, España. Revista Spin Cero. 6 (2002) 65 – 68.

[34] LIENDO, Rigel. Manteca de cacao. Maracay, Aragua, Venezuela. CENIAP. 5 (2004) Disponible: <http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n5/arti/rliendo.htm> (6 Aug. 2008).

[35] RAWEL, H; KULLING, S. Nutritional contribution of coffee, cacao and tea phenolics to human health. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. 2 (2007) 399 – 406.

- [36] RICHELLE, Miriam; Tavazzi, Isabelle; Offord, Elizabeth. Comparison of the antioxidant activity of commonly consumed polyphenolic beverages (coffee, cocoa, and tea) prepared per cup serving. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (2001) 3438 – 3442.
- [37] MARTIN, María; RAMOS, Sonia; MATEOS, Raquel; GRANADO SERRANO, Ana; IZQUIERDO PULIDO, María; BRAVO, Laura; GOYA, Luis. Protection of human hepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56 (2008) 7765 – 7767.
- [38] JALIL, Abbe; ISMAIL, Amin. Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health. *Molecules*. 13 (2008) 2190 – 2219.
- [39] PAREDES SALIDO, Fernando; CLEMENTE FERNANDEZ, Antonio. Polifenoles de aplicación en farmacia: Metabolismo y acción biológica. *Offarm*. 24 (2005) 85 – 94.
- [40] KALVATCHEV, Zlatko; GARZARO, Domingo; GUERRA, Franklin. *Theobroma Cacao L.: Un nuevo enfoque para nutrición y salud*. Caracas, Venezuela. *Agroalimentaria*. 6 (1998) 24 – 25.
- [41] LLAMAS, José. *El Cacao*. Asociación Nacional de Tiendas de Autoservicio y Departamentales (ANTAD). México. (2007) 20 – 21.
- [42] BEWLEY, DEREK; BLACK, Michael; HALMER, Peter. *The encyclopedia of seeds: science, technology and uses*. CABI Publishing Series. (2006) 55 – 57.
- [43] LÓPEZ CAMACHO, René. Fichas de especies no maderables del corregimiento de Tarapacá, Amazonas. Sistema de Información sobre Biodiversidad de Colombia, SIB. 2007. Disponible: <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=392&method=displayAAT> (29 Sep. 2008)
- [44] LIENDO, Rigel. *Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos*. CENIA. Maracay, Venezuela. (2005) 1 – 4.
- [45] SKOOG, Douglas; HOLLER, James; NIEMAN, Timothy. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª Edición. McGraw-Hill. Madrid, España. (2001) 785 – 809.
- [46] RUBINSON, Kenneth; RUBINSON, Judith. *Análisis Instrumental*. Prentice Hall. Madrid, España. (2001) 636 – 708.

- [47] HERRERA, Eliud. Obtención y Caracterización de la Materia Insaponificable del Aceite de Crisálida de *Bombix Mori L.* Híbrido Píamo I. Pereira, Risaralda, 2007. Tesis de grado. Tecnología Química. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología.
- [48] SEWELL, P; CLARKE, B. Chromatographic Separations. Analytical chemistry by open learning. 1ª Edición. John Wiley & Sons.1987.
- [49] HAMILTON, R; HAMILTON, S. Thin Layer Chromatography. Analytical chemistry by open learning. 1ª Edición. John Wiley & Sons. 1987.
- [50] DONG, Michael; AHUJA, Satinder. Handbook of Pharmaceutycal Analysis by HPLC: Separation Science and Technology. 1ª Edición. Academic Press. 2005
- [51] WILLARD, H; MERRITT, L; DEAN, J; SETTLE, F. Métodos instrumentales de análisis. Grupo editorial Iberoamericana. México. 1991.
- [52] GUTIÉRREZ BOUZÁN, Carmen; DROGUET, Marta. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. Boletín Intexter. 122 (2002) 35 – 41.
- [53] OWEN, Tony. Fundamentos de la espectroscopía ultravioleta visible moderna: Conceptos básicos. Agilent Technologies. Alemania. (2000) 2 – 11.
- [54] AVILA TORRES, Yenny Patricia; SÁNCHEZ DIAS, Omaira. Estandarización de métodos espectrofotométricos para la cuantificación de fenoles totales en extractos de plantas melastomatácea. Pereira, Risaralda, 2003. Tesis de grado. Tecnología Química. Grupo Polifenoles. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología.
- [55] PRESCOTT, Lansing; HARLEY, Jhon; KLEIN, Donald. Microbiology. 5ª Edition. McGraw-Hill. (2002) 806 – 810.
- [56] ISADA, Carlos; KASTEN, Bernard; GOLDMAN, Morton; GRAY, Larry; ABERG, Judith. Infectious Diseases Handbook: Including antimicrobial therapy & diagnostic test/procedures. 4º Edition. Diagnostic Medicine Series. Ohio. (2001) 163, 290, 271, 293, 300, 577.
- [57] GARCIA MARTOS, Pedro; PAREDES SALIDO, Fernando; FERNANDEZ DEL BARRIO, María Teresa. Microbiología Clínica Práctica. 2ª Edición. Servicio Publicaciones UCA. (1994) 133 – 138.
- [58] PALAVECINO ROSALES, Elizabeth. Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Boletín de la escuela de medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. 26 (1997) 156 – 160.

- [59] BAUER, A; KIRBY, G; SHERRIS, J; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45 (1966) 493 - 496.
- [60] BARRY, Arthur; AMSTERDAM, Daniel; COYLE, Marie; GERLACH, Hugh; THORNSBERRY, Clyde; HAWKISON, Ronald. Simple inoculum standardizing system for antimicrobial disk susceptibility test. *Journal of Clinical Microbiology*. 10 (1979) 910 – 918.
- [61] VLIETINCK, A. Screening Methods for Detection and Evaluation of Biological Activities of Plant Preparations. *Bioassay Methods in Natural Product Research and Drug Development*. Kluwer Academic Publishers. Sweden. (1998) 37 – 52.
- [62] CERQUETTI, Cristina; GHERARDI, Magdalena. Orally administered attenuated *Salmonella enteritidis* reduces chicken cecal carriage of virulent *Salmonella* challenge organisms. *Veterinary microbiology*. 76 (2000) 185 – 192.
- [63] JARAMILLO, María Isabel. Manual de laboratorio de microbiología. Medios de cultivo. Universidad Tecnológica de Pereira. (2001) 48 – 60.
- [64] AVILA TORRES, Yenny Patricia; Caracterización del homogenizado en isopropanol – agua 65: 35 de *Miconia aeruginosa naudin*. Armenia, Quindío, 2006. Tesis de grado. Química. Universidad del Quindío. Facultad de Química.
- [65] LOPEZ RIOS, Jessica alexandra; TAPIAS ISAZA, Leidy johana. Actividad antibacterial de las fracciones promisorias obtenidas en columna sobre Toyopearl HW 40 del extracto en acetona acuosa (70%) de *Miconia coronata*. Pereira, Risaralda, 2006. Tesis de grado. Tecnología Química. Grupo Polifenoles. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología.
- [66] RUIZ BONILLA, Lady johana; ALZATE ARBELAEZ, Andres felipe. Actividad *in vitro* anti-candida albicans de las fracciones del homogenizado en isopropanol – agua (65:35) de *tibouchina multiflora* y sus hidrólizados. Pereira, Risaralda, 2006. Tesis de grado. Tecnología Química. Grupo Polifenoles. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología.
- [67] Buscador de Medios de Cultivo para Microbiología. Cortés, José Antonio. Disponible: <http://www.joseacortes.com/microbiologia/buscamedios/>(19 Dic. 2008).
- [68] ANDREWS, Jennifer. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48 (2001) 5 – 16.

- [69] GIL, M; MARTÍNEZ, V; GONZÁLEZ, A; ENCIO, I; ARTEAGA C; MIGLACCIO; M; MANU, M. Nuevos agentes antineoplásicos: diseño, síntesis y determinación experimental. Ayudas a la investigación en ciencias de la salud del departamento de salud. 22 (1999) 85 – 92.
- [70] BOBADILLA, Miguel; ZAVALA, Gina; FRANCO, Fanny; POLLACK, Luis; SISNIEGAS, Manuel. Efecto Bioinsecticida del Extracto Etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Mill. “Chirimoya” y *A. muricata* Linneus “guanábana” sobre larvas del IV Estadio de *Anopheles sp.* Revista Peruana de Biología, 9 (2002) 64 – 73.
- [71] ARANGO, Gabriel; DICKSON, John; VELEZ, Iván; MUÑOZ, Diana. Actividad Leishmania panamensis. Revista Vitae. 7 (2000) 38 - 42.
- [72] CARDONA PAREJA, Leonardo; GONZÁLEZ, Paula Andrea. Obtención y caracterización de la oleorresina del ajo (*Allium sativum*). Pereira, Risaralda, 2006. Tesis de grado. Tecnología Química. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología.
- [73] CALDERON G; FLOREZ, J; Obtención de la oleorresina de pimentón rojo (*Capsicum annum L*) y berenjena (*Solanum melongena L*) y su posible uso industrial. Pereira, Risaralda, 2006. Tesis de grado. Tecnología Química. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología.
- [74] SARMENTO, Luiz; MACHADO, Ricardo; PETRUS, José; TAMANINA, Thaisa; BOLZAN, Arioaldo. Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes. Journal of Supercritical Fluids. 45 (2008) 64 – 69.
- [75] OSAWA, K; MIYAZAKI, K; SHIMURA, S; OKUDA, J; MATSUMOTO, M; OOSHIMA, T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: Their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. Journal of Dental Research. 80 (2001) 2000 – 2004.
- [76] KIM, Kyoung; LEE, Ki; KIM, Dong; HWAN, Hyung; KWON, Ik; LEE, Hyong. Extraction and fractionation of glucosyltransferase inhibitors from cacao bean husk. Process Biochemistry. 39 (2004) 2043 – 2046.
- [77] GUERRERO ÁLVAREZ, Gloria Edith. Metabolitos secundarios que diferencian la variedad Colombia de otros genotipos de café. Santafé de Bogotá, Cundinamarca, 2000. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.

- [78] TOLEDO CASTRO, Sandra María; GONZÁLEZ LAVAUT, José Antonio; ECHEMENDÍA, Olga; GARCÍA GONZÁLEZ, Nelson. Evaluación fitoquímica y farmacológica de frutos de *Erythroxylum minutifolium* Griseb (Erythroxylaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 13 (2008) 1 – 6.
- [79] OWADES, J; RUBIN, G; BRENNER M. Determination of food tannins by ultraviolet spectrophotometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 6 (1958) 44 – 46.
- [80] MORATA, A; CALDERON, F; GONZÁLEZ, M; VARELA, F; COLOMO, B; UTHURRY, C; SUÁREZ, J. Microbiología. Mundi – Prensa Ediciones. 3ª Edición. Valencia, España. (2004) 17 – 127.
- [81] PRESCOTT, J; BAGGOT, J; WALTER, R. Principles of Antimicrobial drug selection and use in antimicrobial therapy in Veterinary Medicine. 4ª Edition. Iowa (2000). 27 – 49.
- [82] LIJUN, Wang; CURTIS, Weller. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. Trends in Food Science & Technology. 17 (2006) 300 – 312.
- [83] NIETO RAMIREZ, Ivonne Jeannette; CHEGWIN ANGARITA, Carolina; OSORIO ZULUAGA, Héctor Jairo. Incorporación de cafeína en el hongo *Pleurotus sajor-caju* cultivado sobre pulpa de café. Revista Iberoamericana de Micología. 24(2007) 72 – 74.
- [84] PADILLA, Fanny; LIENDO, Rigel; Quintana, Agricia. Characterization of cocoa butter extracted from hybrid cultivars of *Theobroma cacao* L. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50 (2000) 200 – 205.
- [85] ELKHORI, Sandra; PARÉ, Jocelyn; BÉLANGER, Jacqueline; PÉREZ, Elevina. The microwave-assisted process (MAP^{TM1}): Extraction and determination of fat from cocoa powder and cocoa nibs. Journal of Food Engineering. 79 (2007) 1110 – 1114.
- [86] HANSEN, A; WELTY, R; SHEN, R. Free fatty acid content of cacao beans infested with storage fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 21 (1973) 665 – 670.
- [87] WEN, M; KINSELLA, J. Fatty Acid Composition of suspension cell cultures of *Theobroma cacao* are altered by culture conditions. Journal of Food Science. 57 (1992) 1452 – 1453.

- [88] MOSQUERA MARTINEZ, Oscar Marino. Características Espectroscópicas de Algunas Funciones Orgánicas. Universidad Tecnológica de Pereira. (1991) 7 – 100
- [89] ALIA, Iran; COLINAS, Teresa; MARTINEZ, Maria Teresa. (2005). Análisis preliminar de compuestos carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de Zapote Mamey (*Pouteria sapota*). Revista Chapingo. 11 (2005) 225 – 231.
- [90] MOSQUERA MARTINEZ, Oscar Marino. Seminario: Los Flavonoides. Universidad del Valle. (1979) 29 – 32.
- [91] OSCANOVA LAGUNAS, Julio Miguel. Estudio Fármaco-Botánico de *Desmodium molliculum*. Perú. (2005). 3 – 40.
- [92] MARTINEZ, Alejandro. Flavonoides. Universidad de Antioquia. (2005) 8 – 60.
- [93] WATERHOUSE, Andrew. Determination of Total Phenolics. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. (2002) Supplement 6. Unit I 1.1.1 – I 1.1.8.
- [94] JONFIA ESSIEN, W; WES, G; ALDERSON, P; TUCKER, G. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. Food Chemistry. 108 (2008) 1155 – 1159.
- [95] NIEMENAK, Nicolas; ROHSIUS, Christina; ELWERS, Silke; NDOUMOU, Denis; LIEBEREI, Reinhard. Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao L.*) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. Journal of Food Composition and Analysis. 19 (2006) 612 – 619.
- [96] OSMAN, H; NASARUDIN, R; LEE, S. Extracts of cocoa (*Theobroma cacao L.*) leaves and their antioxidation potential. Food Chemistry. 86 (2004) 41 – 46.
- [97] VIDAL NOVOA, Alexis; MOTIDOME, Mario; MANCINI FILHO, Jorge; FALLARERO LINARES, Adyary; MIDORI TANAE, Mirtes; BRANDAO TORRES, Luce María; LAPA, Antonio José. Actividad antioxidante y ácidos fenólicos del alga marina *Bryothamnion triquetrum* (S.G.Gmelim) Howe. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 37 (2001) 373 – 377.
- [98] VÁSQUEZ CARDEÑO, Ángela; CALA MOLINA, Mónica; et al. Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de *Salvia aratocensis*, *Salvia sochensis*, *Bidens reptans* y *Montanoa ovalifolia*. Revista Scientia et Technica. 33 (2007) 205 – 207.
- [99] MARTINEZ VALVERDE, Isabel; PERIAGO, María Jesús; ROS, Gaspar. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50 (2000) 1 – 15.

- [100] DAVIS, Barry; BRODBELT, Jennifer. Determination of the glycosylation site of flavonoid monoglucosides by metal complexation and tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 15 (2004) 1287 – 1299.
- [101] NUENGCHAMNONG, Nitra; HERMANS-LOKKERBOL, Ank; INGKANINAN, Kornkanok. Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on – line with colorimetric detection of antioxidant activity. *Naresuan University Journal*. 12 (2004) 25 – 37.
- [102] HARBORNE, T; MABRY, J. *The Flavonoids: Advances in Research*. Febs Letters. 158 (1983) 192 – 196.
- [103] DE RIJKE, Eva. OUT, Peter; NIESSEN, Wilfried; ARIESE, Freek; GOOIJER, Cees; BRINKMAN, Udo. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 1112 (2006) 31 – 63.
- [104] KAWSAR, S; HUQ, E; NAHAR, N; OZEKI, Y. Identification and quantification of phenolic acids in *Macrotyloma uniflorum* by reversed phase – HPLC. *American Journal of Plant Physiology*. 3 (2008) 165 – 172.
- [105] KUMAZAWA, Takeshi; SENO, Hiroshi; LEE, Xiao-Pen; ISHII, Akira; WATANABE SUZUKI, Kanako; SATO, Keizo; SUZUKI, Osamu. Extraction of methylxanthines from human body fluids by solid-phase microextraction. *Analytica Chemical Acta*. 387 (1999) 53 – 60.
- [106] BROOKS, Geo. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. México. 18ª Edición. (2005) 696 – 705.
- [107] DIXON, Richard. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411(2001) 843 – 844.
- [108] Li, X; JACOB, M; PASCO, D; ELSOHLY, H; Nimrod, A; Walker, L; Clark, A. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida aspartic* proteases. *Journal of Natural Products*. 64 (2001) 1282 - 12855.
- [109] CALLE CHAURRA, Lina Marcela; JIMÉNEZ GONZÁLEZ, Francisco Javier. Actividad ictiotóxica, antibacteriana y antifúngica de polifenoles del extracto en acetato de etilo de *Miconia coronata*. Pereira, Risaralda, 2002. Tesis de grado. Tecnología Química. Grupo Polifenoles. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología.

- [110] MARIN CASTAÑO, Darwin; BONILLA RODRIGUEZ, Ingrid Paola. Actividad antibacteriana contra *Salmonella gallinarum* y *Escherichia coli* del extracto en acetona acuosa (70%) de *Miconia coronata*. Pereira, Risaralda, 2004. Tesis de grado. Tecnología Química. Grupo Polifenoles. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de tecnología.
- [111] ÁVILA, Liliana; BAQUERO, Eduard; VIÑA, Amparo; MURILLO, Elizabeth. Actividad antibacteriana de *Diplostegium tolimense* Cuatrec (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. Revista VITAE. 13 (2006) 55 – 60.
- [112] TEIXEIRA DUARTE, Marta Cristina; LEME, Ewerton Eduardo; DELARMELINA, Camila; ALMEIDA SOARES, Andressa; FIGUEIRA, Glyn Mara; SARTORATTO, Adilson. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. Journal of Ethnopharmacology. 111 (2007) 197 – 201.
- [113] SHAN, Bin; CAI, Yi; BROOKS, John; CORKE, Harold. Antibacterial properties of *Polygonum cuspidatum* roots and their major bioactive constituents. Food Chemistry. 109 (2008) 530 – 537.
- [114] REIDA, K; J'AGER, A; LIGHT, M; MULHOLLAND, D; STADEN, J. Phytochemical and pharmacological screening of *Sterculiaceae* species and isolation of antibacterial compounds. Journal of Ethnopharmacology. 97 (2005) 285 – 291.
- [115] GIRI, A; DAS, M; REDDY, V; PAL, A. Mutagenic and genotoxic effects of theophylline and theobromine in *Salmonella* assay and in vivo sister chromatid exchanges in bone marrow cells of mice. Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 444 (1999) 17 – 23.
- [116] TIMSON, J. Theobromine and theophylline. Mutation Research / Reviews in Genetic Toxicology. 32 (1975) 169 – 177.
- [117] IBRAHIM, S; SALAMEH, M; PHETSOMPHOU, S; YANG, H; SEO, C. Application of caffeine, 1,3,7-trimethylxanthine, to control *Escherichia coli* O157:H7. Food Chemistry. 99 (2006) 645 – 650.
- [118] ROSENKRANZ, H; ENNEVER, F. Evaluation of the genotoxicity of theobromine and caffeine. Food and Chemical Toxicology. 25 (1987) 247 – 251.
- [119] ALZAMORA, Stella Maris, GUERRERO, Sandra Norma; NIETO, Andrea Bibiana, VIDALES, Susana Leontina. Manual de capacitación: conservación de frutas y hortalizas mediante tecnologías combinadas. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación, FAO. (2004) 12 – 15.

[120] STAVRIC, B. Methylxanthines: Toxicity to humans. 3. Theobromine, paraxanthine and the combined effects of methylxanthines. *Food and Chemical Toxicology*. 26 (1988) 725 – 733.

ANEXOS

ANEXO 1. Lista de la Composición de agares y caldos (g / L)

Composición de agares

Agar Mueller – Hinton:

Infusión de carne: 2.0
Hidrolizado de caseína: 17.5
Almidón: 1.5
Agar – agar: 13.0

Agar Nutritivo:

Extracto de carne: 1.0
Extracto de levadura: 2.0
Peptona: 5.0
Cloruro sódico: 5.0
Agar – agar: 15.0
pH : 7.4 ± 0.2

Agar Dextrosa – Sabouraud

Dextrosa: 40.0
Peptona de caseína: 5.0
Digerido pancreático de tejido animal: 5.0
Agar: 15.0
pH: 5.6 ± 0.2
Composición de caldos

Composición de agares

Infusión Cerebro – Corazón

Extracto de cerebro de ternera: 12.5
Extracto de corazón bovino: 5.0
Proteasa peptona: 5.0
Cloruro sódico: 5.0
Fosfato disódico: 2.5
Glucosa: 2.0
pH: 7.4 ± 0.2

ANEXO 2. Gráfica de Identificación y Cuantificación de alcaloides y fenoles por CLAE

Identificación de alcaloides y fenoles



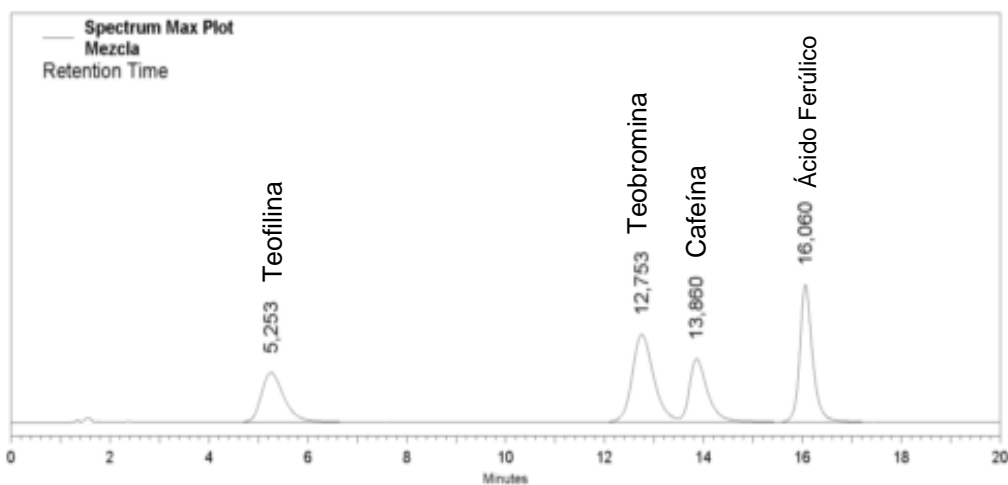
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
GRUPO POLIFENOLES UTP

Page 1 of 2



LABORATORIO DE CALIDAD DE PRODUCTOS NATURALES

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Oleoquimica\Data\Mezcla15-04-2009
13-36-31.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Oleoquimica\Method\Alcaloides9.met
Acquired: 15/04/2009 13:37:53
Descripción: {Data Description}
Injection volume: 10



Spectrum Report

Spectra of all detected peaks between 0,00 and 25,00 minutes

(The peak spectrum is defined as the peak apex spectrum)

Spectrum Max Plot Spectra

Cuantificación de alcaloides y fenoles



UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
GRUPO POLIFENOLES UTP



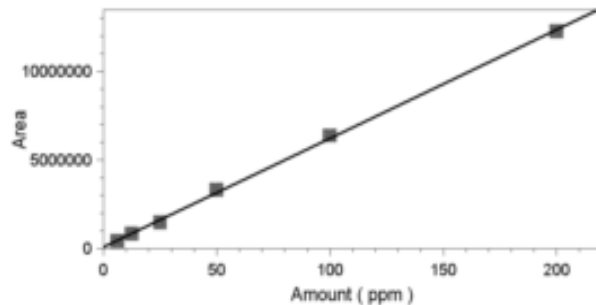
LABORATORIO DE CALIDAD DE PRODUCTOS NATURALES

Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Oleoquimica\Method\Alcaloides9cal.met
Inj. volume: 10

Teofilina (1: 270 nm, 4 nm)
Average RF: 64094,0 RF StDev: 3285,51 RF %RSD: 5,12607
Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off
Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)
Fit Type: Linear
 $y = 61342,1x + 91287,2$
Goodness of fit (r^2): 0,999189

	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6
Amount	6,25	12,5	25	50	100	200
Area	414402	844572	1479885	3319049	6380256	12263007
RF	66304,32	67565,76	59195,4	66380,98	63802,56	61315,035
Last Area						
Residual	0,982575	0,219935	2,36305	-2,61904	-2,5229	1,57638
Rep StDev						
Rep %RSD						
Rep 1 Area	414402	844572	1479885	3319049	6380256	12263007

Peak: Teofilina -- ESTD -- 1: 270 nm, 4 nm



Teofilina

Teobromina (1: 270 nm, 4 nm)

Average RF: 92117,7 RF StDev: 4875,78 RF %RSD: 5,29299

Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off

Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)

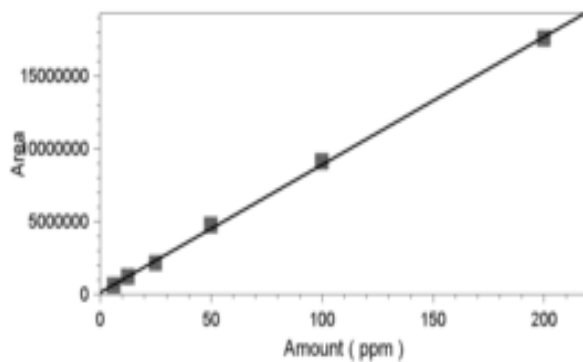
Fit Type: Linear

$y = 87684,9x + 135855$,

Goodness of fit (r^2): 0,999292

	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6
Amount	6,25	12,5	25	50	100	200
Area	606976	1207216	2133939	4745779	9100727	17546433
RF	97116,16	96577,28	85357,56	94915,58	91007,27	87732,165
Last Area						
Residual	0,877118	0,281699	2,21292	-2,57373	-2,2396	1,4416
Rep StDev						
Rep %RSD						
Rep 1 Area	606976	1207216	2133939	4745779	9100727	17546433

Peak: Teobromina -- ESTD -- 1: 270 nm, 4 nm



Teobromina

Cafeina (1: 270 nm, 4 nm)

Average RF: 65796,2 RF StDev: 3890,13 RF %RSD: 5,91239

Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off

Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)

Fit Type: Linear

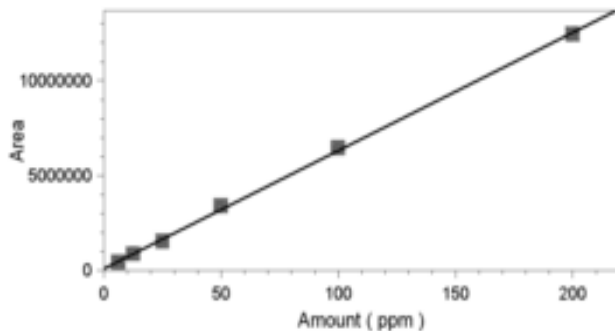
$y = 62159,4x + 107980$,

Goodness of fit (r^2): 0,999212

	Level 1	Level 2	Level 3
Amount	6,25	12,5	25
Area	437390	868951	1515915
Last Area			
Residual	0,950563	0,257753	2,34961
Rep StDev			
Rep %RSD			
Rep 1 Area	437390	868951	1515915

	Level 4	Level 5	Level 6
Amount	50	100	200
Area	3386397	6468362	12446136
RF	67727,94	64683,62	62230,68
Last Area			
Residual	-2,74208	-2,32371	1,50786
Rep StDev			
Rep %RSD			
Rep 1 Area	3386397	6468362	12446136

Peak: Cafeina -- ESTD -- 1: 270 nm, 4 nm



Cafeína

Ácido ferúlico (4: 320 nm, 4 nm)

Average RF: 97316,6 RF StDev: 5049,40 RF %RSD: 5,18863

Scaling: None LSQ Weighting: None Force Through Zero: Off

Replicate Mode: Wt Average (Weight: 0)

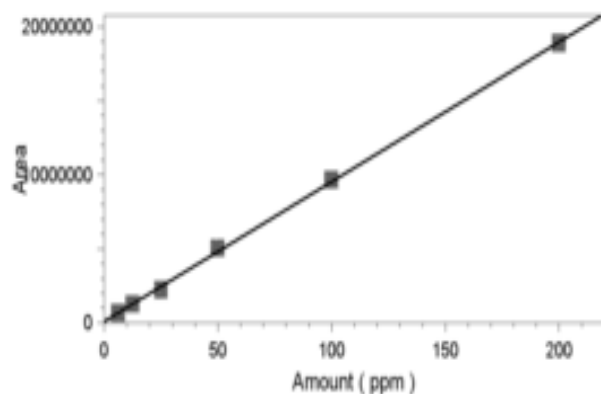
Fit Type: Linear

$y = 94433,9x + 85575,2$

Goodness of fit (r^2): 0,999490

	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6
Amount	6,25	12,5	25	50	100	200
Area	638215	1265575	2224466	5027846	9660106	18880575
RF	102114,4	101246	88978,64	100556,92	96601,06	94402,875
Last Area						
Residual	0,397864	0,00448393	2,35038	-2,33579	-1,38875	0,971811
Rep StDev						
Rep %RSD						
Rep 1 Area	638215	1265575	2224466	5027846	9660106	18880575

Peak: Ácido ferúlico -- ESTD -- 4: 320 nm, 4 nm



Ácido Ferúlico

ANEXO 3. Lista de reactivos, cepas e instrumentos

Reactivos y Cepas

- Hexano
- Etanol Absoluto
- Agua destilada
- Cloroformo
- Acetato de etilo al 99%
- Metanol Grado Analítico
- Metanol Grado cromatográfico
- Ácido clorhídrico concentrado
- Hidróxido de sodio concentrado
- Ácido fosfórico al 85%
- Acetonitrilo Grado cromatográfico
- Carbonato de sodio anhidro
- Sulfato de sodio anhidro
- Tugstato de sodio
- Molibdato de sodio
- Sulfato de Litio
- Bromo^(l)
- Cromatofolios TLC 20x20 cm Silicagel 60_{F254} Merk
- Estándar de Theobromina
- Estándar de cafeína
- Estándar de teofilina
- Estándar de Acido ferúlico
- Dimetilsulfóxido grado analítico (Phyto Technology Laboratories D241)
- Caldo BHI “Infusión cerebro corazón” (Merck 1.10493.0500)
- Agar Mueller Hinton (Merck 1.05437.0500)
- *Escherichia coli* aislada de pollo de granja avícola, Manizales (Caldas) “resistente a amoxicilina” No. 1
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Bacillus cereus* ATCC 11778
- *Streptococo agalactiae* – Hemolítico aislado de un paciente en el laboratorio Clínico Lòpez Correa de Pereira, Colombia.
- *Candida albicans* ATCC 10231

Instrumentos

- Nevera TEMFLOW
- Estufa marca APT lineTM BINDER
- Incubadora WTC Binder
- Balanza Analítica Electrónica Metler Toledo AB204 Precisión ± 0.0001 g
- Rotaevaporador Laborota 4003-Control Heidolph
- Espectrofotómetro UV-1700 PharmaSpec Shimadzu
- Ultrasonido UltrasonikTM Cleaner, Modelo No. 19H
- Agitado magnético Corning stirrer
- Micropipeta *eppendorf reference*
- Incubadora WTC Binder

ANEXO 4. Tabla del peso de los extractos secos de cáscara de cacao

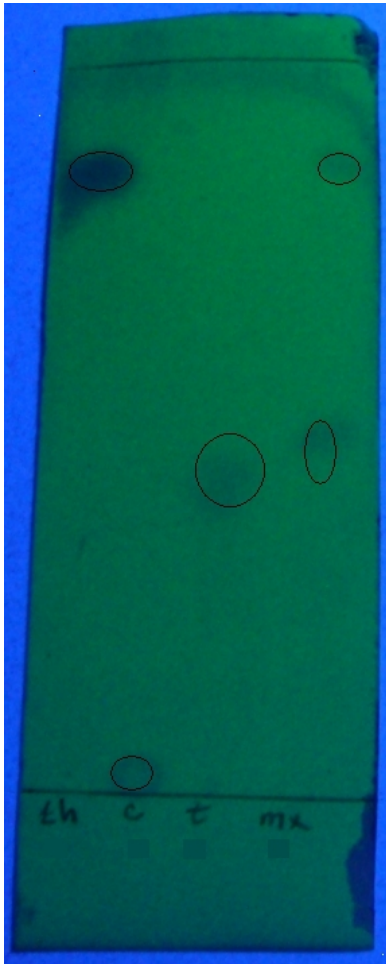
Método de Ultrasonido

Ensayo	Masa cáscara de cacao	Masa ext. CHCl ₃	Masa ext. AcOEt	Masa ext. But – OH	Masa ext. Ac
1	20,0085	0,1031	0,0640	0,2023	3,0067
2	20,0028	0,1005	0,0646	0,2029	3,0070
3	20,0050	0,0946	0,0637	0,2033	3,0052

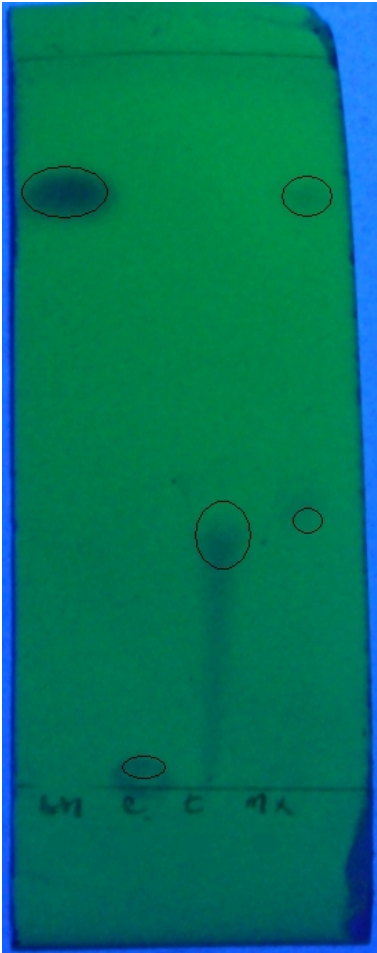
Método de Agitación Magnética

Ensayo	Masa cáscara de cacao	Masa ext. CHCl ₃	Masa ext. AcOEt	Masa ext. But – OH	Masa ext. Ac
1	20,0010	0,0765	0,0549	0,1708	1,6233
2	20,0030	0,0822	0,0559	0,1698	1,6247
3	20,0078	0,0862	0,0556	0,1702	1,6232

ANEXO 5. Cromatoplasmas de la separación de los componentes del extracto clorofórmico obtenido por ultrasonido y agitación magnética



Extracto CHCl_3 - US



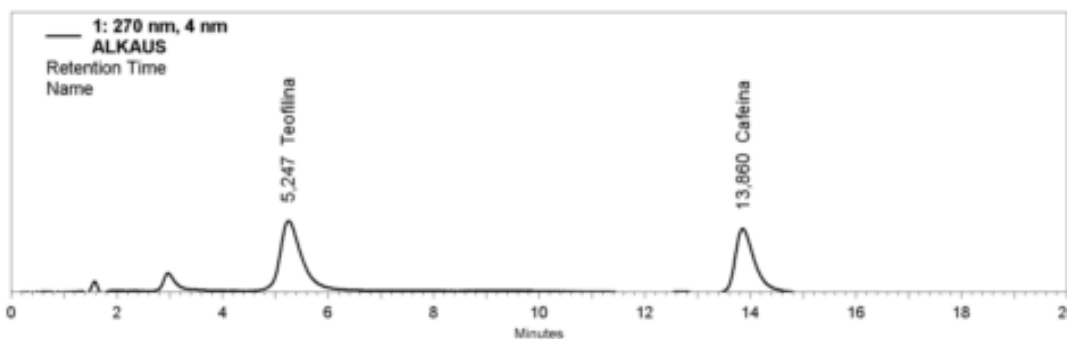
Extracto CHCl_3 - AG

ANEXO 6. Cuantificación de alcaloides en los extractos clorofórmicos por ultrasonido y agitación magnética



LABORATORIO DE CALIDAD DE PRODUCTOS NATURALES

Data File: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Oleoquimica\Data\ALKAUS20-04-2009
17-41-16.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Oleoquimica\Method\Alcaloides9cal.met
Inj, volume: 10



1: 270 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	ESTD concentration
Teofilina	5,247	705832	10,018
Teobromina			0,000 BDL
Cafeina	13,860	590767	7,767
Ácido ferúlico			0,000 BDL
Totals		1296599	17,785

Spectrum Report

Spectra of all detected peaks between 0,00 and 20,00 minutes

(The peak spectrum is defined as the peak apex spectrum)

Ultrasonido

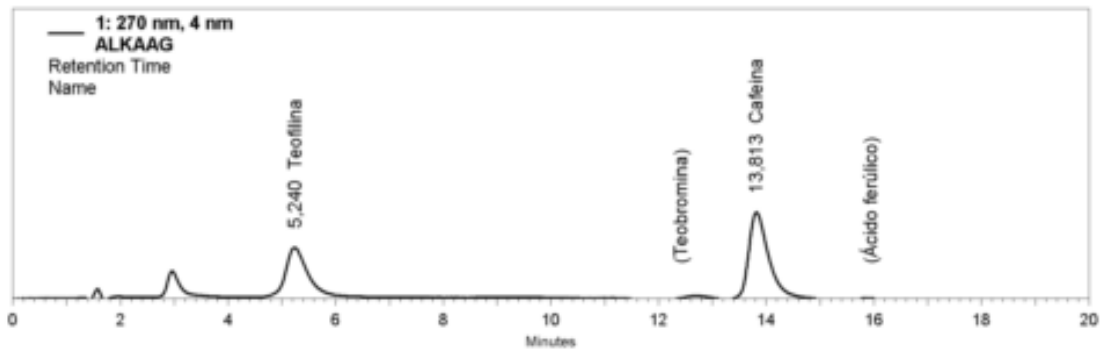


UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
GRUPO POLIFENOLES UTP



LABORATORIO DE CALIDAD DE PRODUCTOS NATURALES

Data File: C:\EZChrom
Elite\Enterprise\Projects\Oleoquimica\Data\ALKAAG20-04-2009 18-13-40.dat
Method: C:\EZChrom Elite\Enterprise\Projects\Oleoquimica\Method\Alcaloides9cal.met
Inj, volume: 10



1: 270 nm, 4 nm Results

Name	Time	Area	ESTD concentration
Teofilina	5,240	484479	6,410
Teobromina			0,000 BDL
Cafeina	13,813	748957	10,312
Ácido ferúlico			0,000 BDL
Totals		1233436	16,722

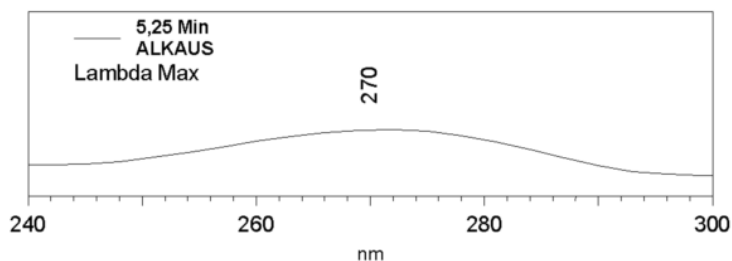
Spectrum Report

Spectra of all detected peaks between 0,00 and 20,00 minutes

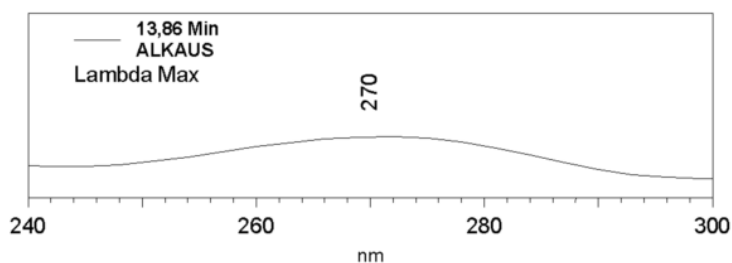
(The peak spectrum is defined as the peak apex spectrum)

Agitación Magnética

ANEXO 7. Espectros ultravioleta de alcaloides identificados en los extractos clorofórmicos obtenidos por ultrasonido y agitación magnética

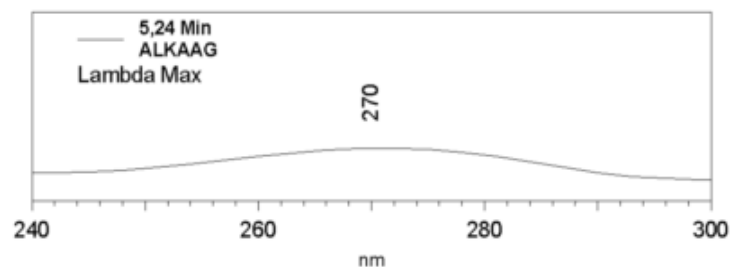


Retention time: 5,247 Min
Peak name: Teofilina
Lambda max: 270, 338, 380

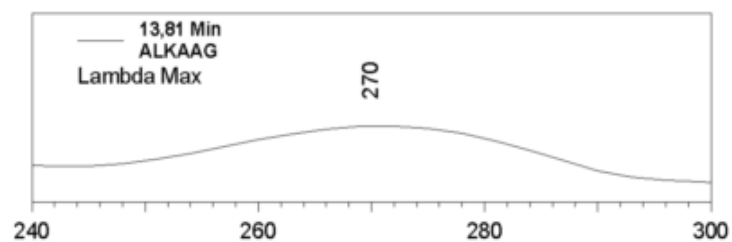


Retention time: 13,860 Min
Peak name: Cafeina
Lambda max: 270, 383, 347

Ultrasonido



Retention time: 5,240 Min
Peak name: Teofilina
Lambda max: 270, 387



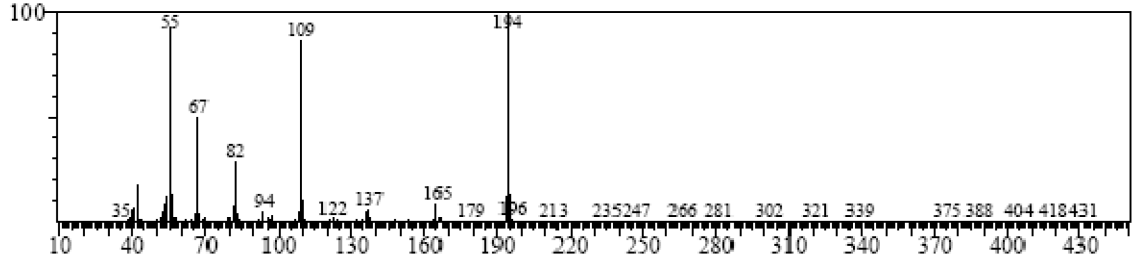
Retention time: 13,813 Min
Peak name: Cafeina
Lambda max: 270, 387, 337

Agitación Magnética

ANEXO 8. Espectro de masas del pico con Tr = 14 minutos

<< Target >>

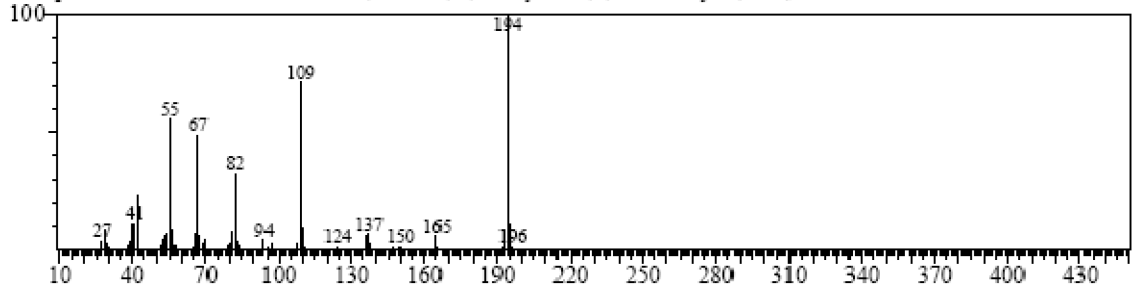
Line#:1 R.Time:14.058(Scan#:1448) Retention Index:0 MassPeaks:215
RawMode:Averaged 14.050-14.067(1447-1449) BasePeak:193.95(253596)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:115543 Library:WILEY7N2.LIB

SI:93 Formula:C8H10N4O2 CAS:58-08-2 MolWeight:194 RetIndex:0

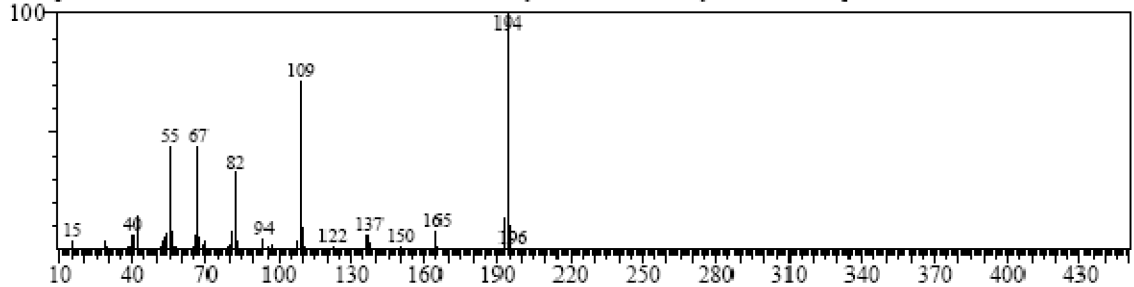
CompName:Caffeine \$\$ 1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl- (CAS) \$\$ THEOPHYLLINE METHYL S



Hit#:2 Entry:115547 Library:WILEY7N2.LIB

SI:93 Formula:C8H10N4O2 CAS:58-08-2 MolWeight:194 RetIndex:0

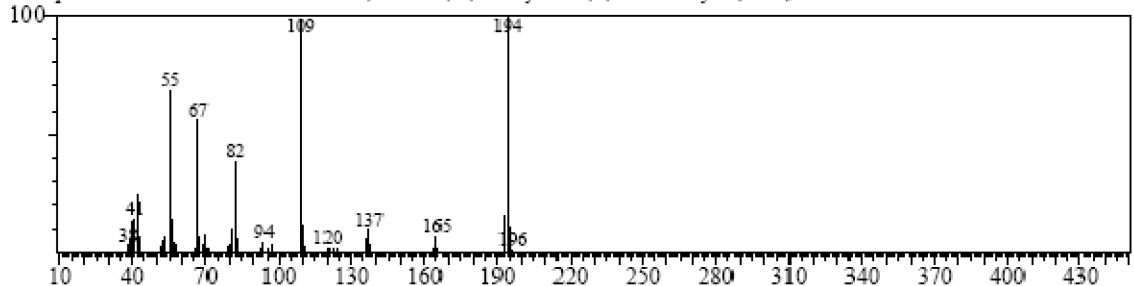
CompName:Caffeine \$\$ 1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl- \$\$ Alert-Pep \$\$ Cafeina \$\$ Caffein \$\$ Ca



Hit#:3 Entry:115561 Library:WILEY7N2.LIB

SI:92 Formula:C8H10N4O2 CAS:58-08-2 MolWeight:194 RetIndex:0

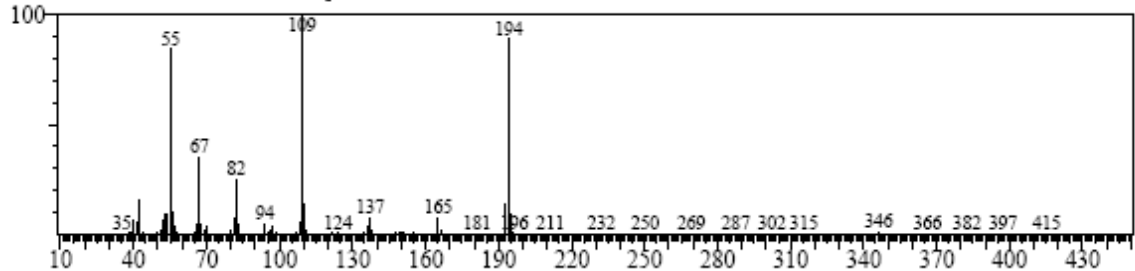
CompName:Caffeine \$\$ 1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl- (CAS) \$\$ THEOPHYLLINE METHYL S



Ultrasonido

<< Target >>

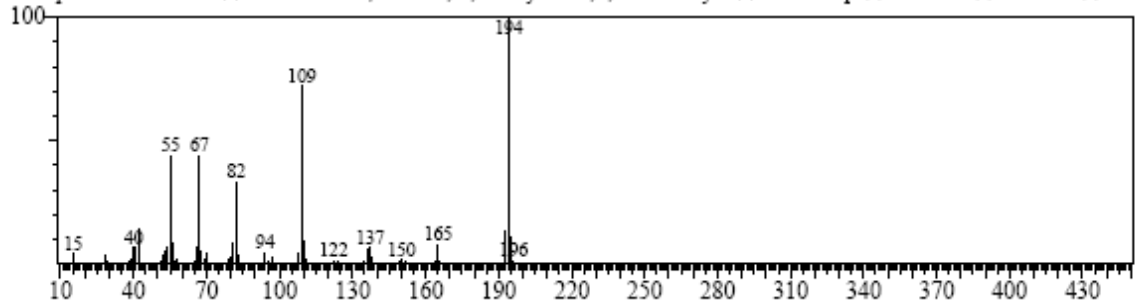
Line#:1 R.Time:14.050(Scan#:1447) Retention Index:0 MassPeaks:250
RawMode:Averaged 14.042-14.058(1446-1448) BasePeak:109.05(161468)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:115547 Library:WILEY7N2.LIB

SI:92 Formula:C8H10N4O2 CAS:58-08-2 MolWeight:194 RetIndex:0

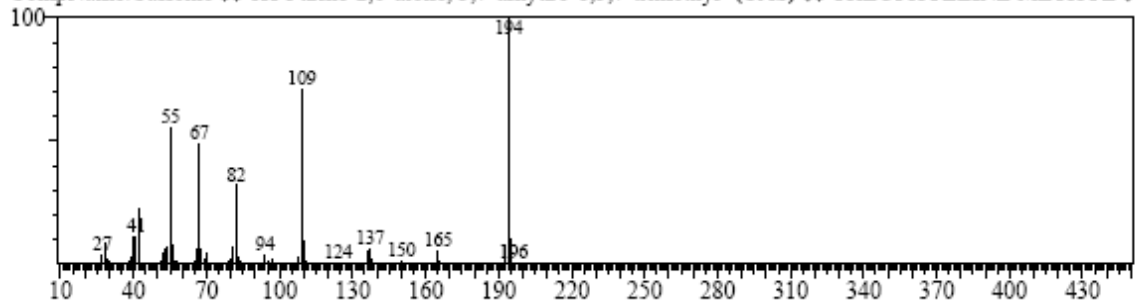
CompName:Caffeine \$\$ 1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl- \$\$ Alert-Pep \$\$ Cafeina \$\$ Caffein \$\$ Ca



Hit#:2 Entry:115543 Library:WILEY7N2.LIB

SI:90 Formula:C8H10N4O2 CAS:58-08-2 MolWeight:194 RetIndex:0

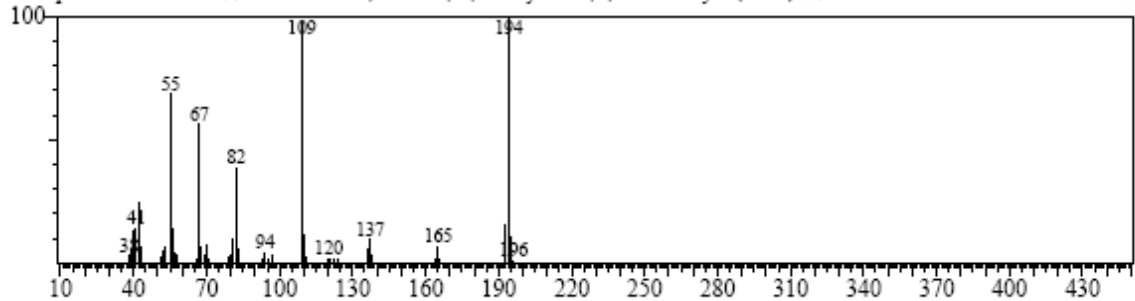
CompName:Caffeine \$\$ 1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl- (CAS) \$\$ THEOPHYLLINE METHYL S



Hit#:3 Entry:115561 Library:WILEY7N2.LIB

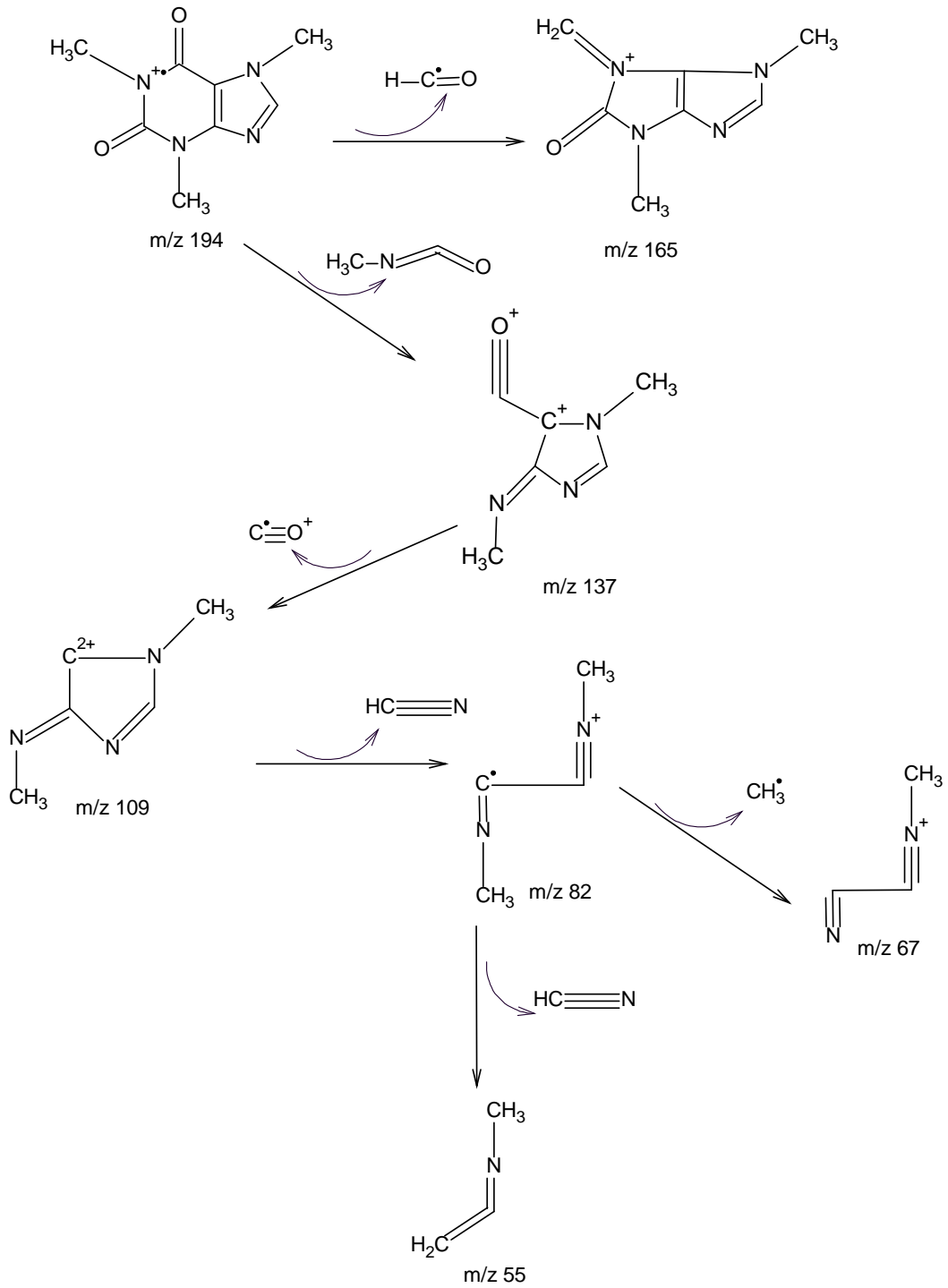
SI:90 Formula:C8H10N4O2 CAS:58-08-2 MolWeight:194 RetIndex:0

CompName:Caffeine \$\$ 1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl- (CAS) \$\$ THEOPHYLLINE METHYL S



Agitación Magnética

ANEXO 9. Fragmentación de Cafeína

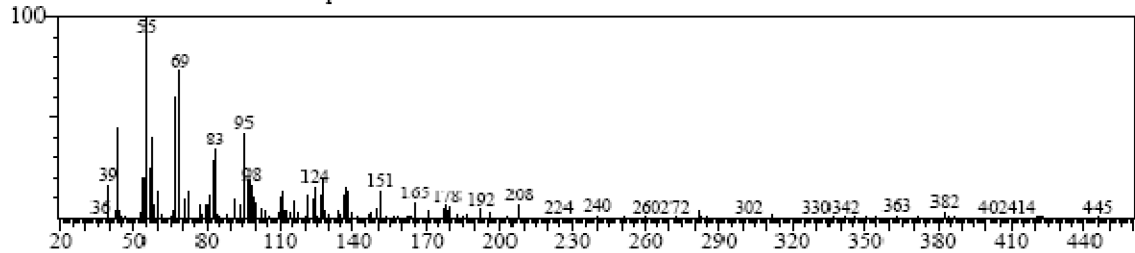


ANEXO 10. Espectros de masas de posibles ácidos grasos en cáscara de cacao

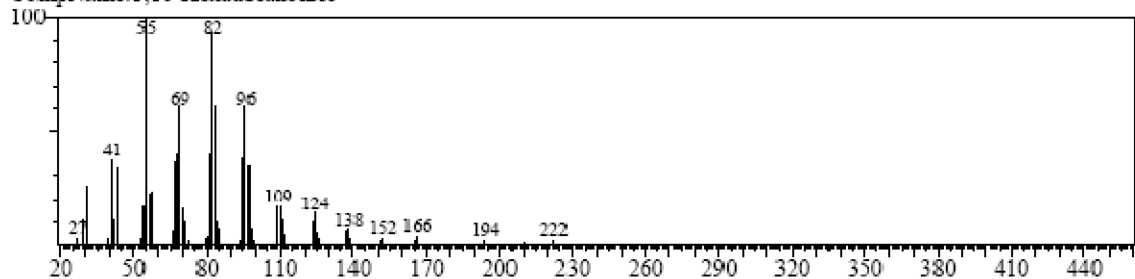
Espectro de masas del pico con Tr = 16,67 minutos

<< Target >>

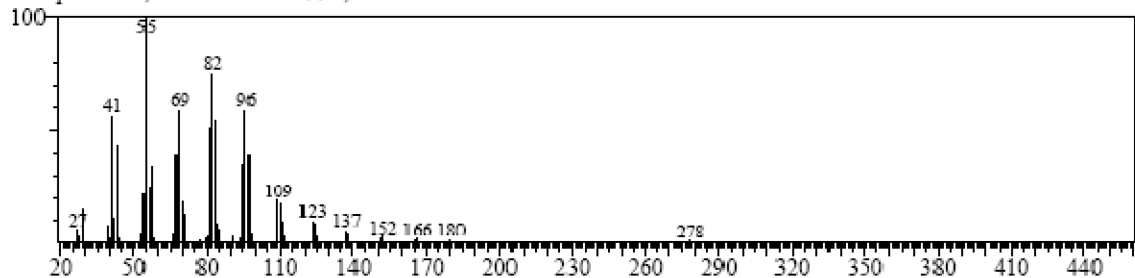
Line#:6 R.Time:16.767(Scan#:1773) Retention Index:0 MassPeaks:232
RawMode:Averaged 16.758-16.775(1772-1774) BasePeak:55.10(14268)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



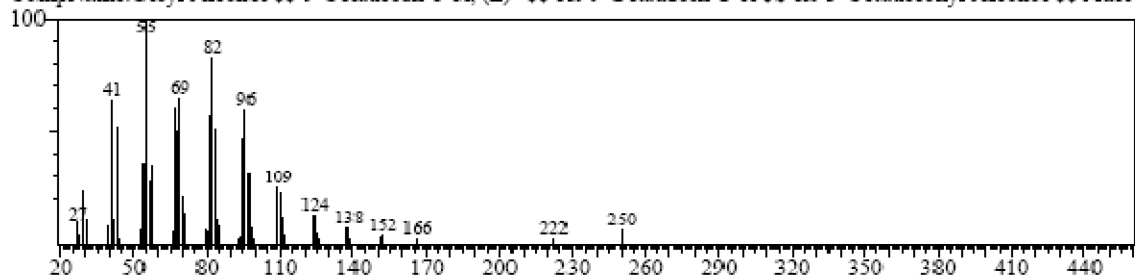
Hit#:1 Entry:220984 Library:WILEY7N2.LIB
SI:74 Formula:C16H34O2 CAS://55-42-4 MolWeight:258 RetIndex:0
CompName:1,16-Hexadecanediol



Hit#:2 Entry:251277 Library:WILEY7N2.LIB
SI:74 Formula:C20H38 CAS:14811-95-1 MolWeight:278 RetIndex:0
CompName:1,19-Eicosadiene \$\$ 1,19-Icosadiene #



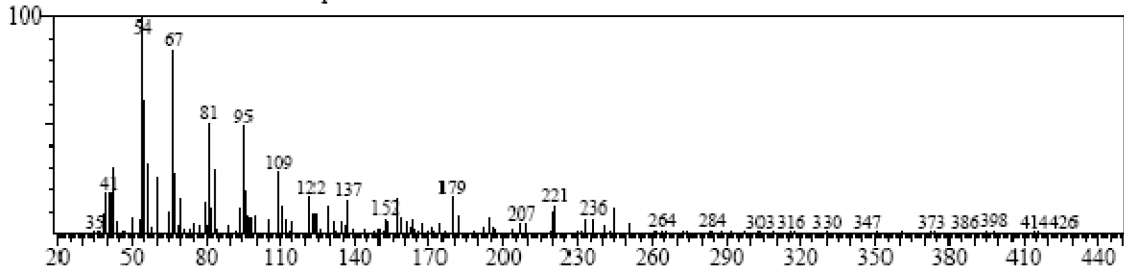
Hit#:3 Entry:236600 Library:WILEY7N2.LIB
SI:74 Formula:C18H36O CAS:143-28-2 MolWeight:268 RetIndex:0
CompName:Oleyl Alcohol \$\$ 9-Octadecen-1-ol, (Z)- \$\$ cis-9-Octadecen-1-ol \$\$ cis-9-Octadecenyl Alcohol \$\$ Adol



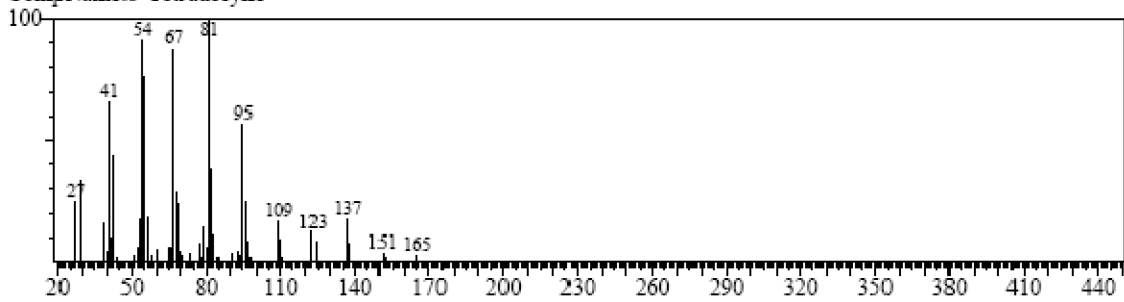
Ultrasonido

<< Target >>

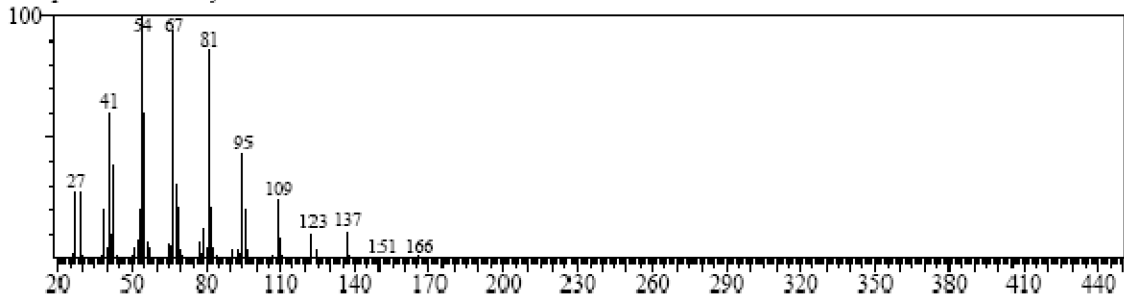
Line#:4 R.Time:16.717(Scan#:1767) Retention Index:0 MassPeaks:224
RawMode:Averaged 16.708-16.725(1766-1768) BasePeak:54.00(11217)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



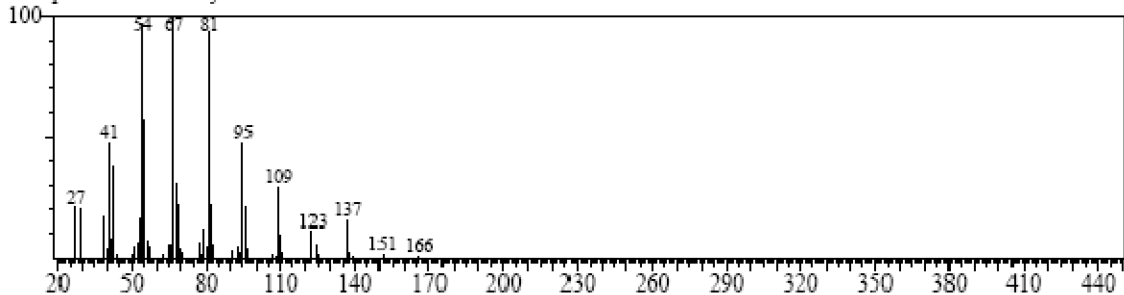
Hit#:1 Entry:117652 Library:WILEY7N2.LIB
SI:76 Formula:C14H26 CAS:60212-34-2 MolWeight:194 RetIndex:0
CompName:5-Tetradecyne



Hit#:2 Entry:74719 Library:WILEY7N2.LIB
SI:76 Formula:C12H22 CAS:19780-12-2 MolWeight:166 RetIndex:0
CompName:5-Dodecyne \$\$ 5-C12H22



Hit#:3 Entry:74718 Library:WILEY7N2.LIB
SI:75 Formula:C12H22 CAS:19780-12-2 MolWeight:166 RetIndex:0
CompName:5-Dodecyne



Agitación Magnética

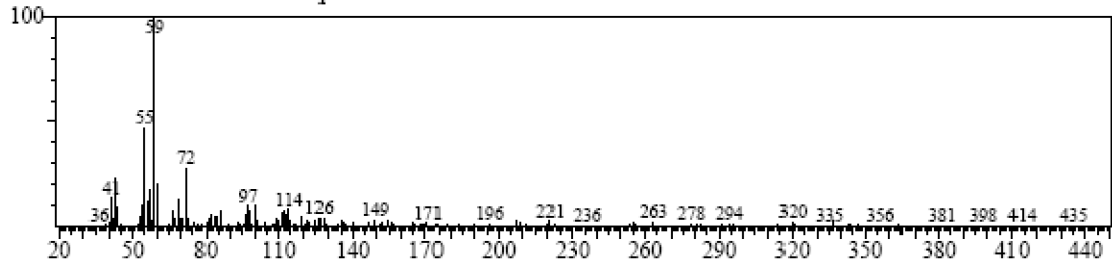
Espectro de masas del pico con Tr = 21,93 minutos

<< Target >>

Line#:11 R.Time:21.933(Scan#:2393) Retention Index:0 MassPeaks:261

RawMode:Averaged 21.925-21.942(2392-2394) BasePeak:58.95(93645)

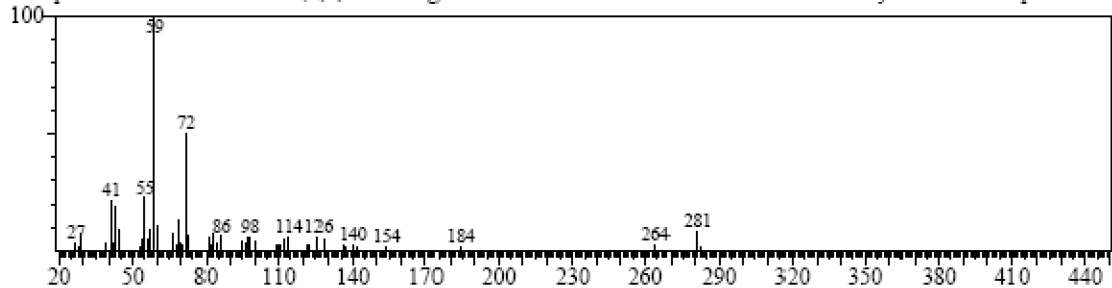
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:255007 Library:WILEY7N2.LIB

SI:85 Formula:C18H35NO CAS:301-02-0 MolWeight:281 RetIndex:0

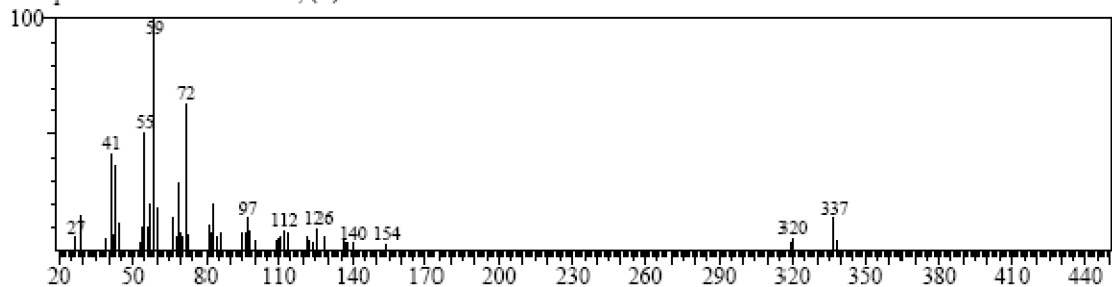
CompName:9-Octadecenamide, (Z)- \$\$ Adogen 73 \$\$ Oleamide \$\$ Oleic acid amide \$\$ Oleyl amide \$\$ Slip-eze \$\$ /



Hit#:2 Entry:327007 Library:WILEY7N2.LIB

SI:84 Formula:C22H43NO CAS:112-84-5 MolWeight:337 RetIndex:0

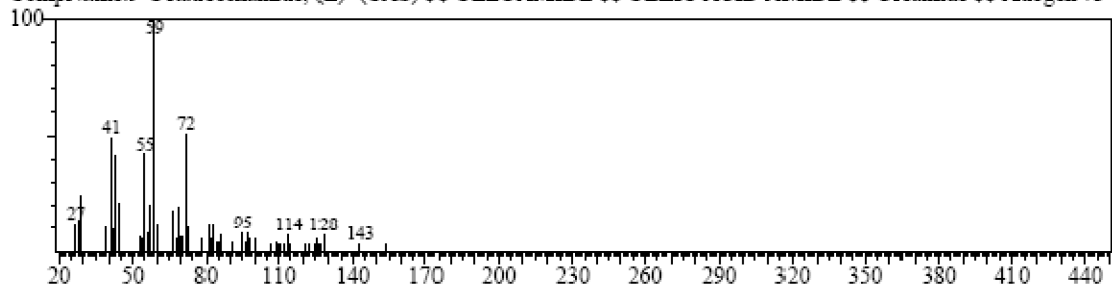
CompName:13-Docosenamide, (Z)-



Hit#:3 Entry:255008 Library:WILEY7N2.LIB

SI:84 Formula:C18H35NO CAS:301-02-0 MolWeight:281 RetIndex:0

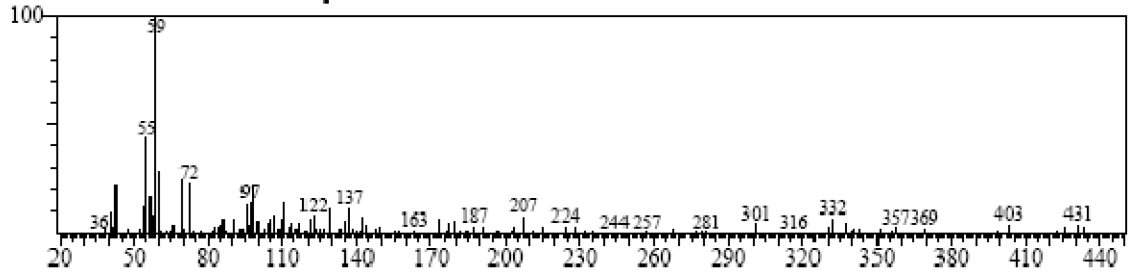
CompName:9-Octadecenamide, (Z)- (CAS) \$\$ OLEOAMIDE \$\$ OELIC ACID AMIDE \$\$ Oleamide \$\$ Adogen 73



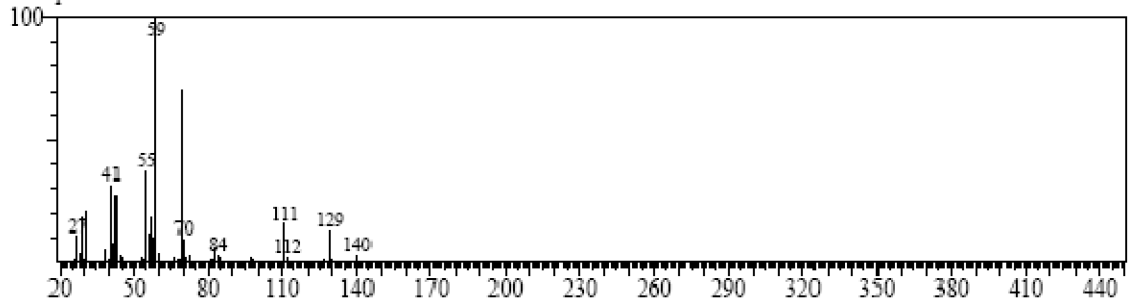
Ultrasonido

<< Target >>

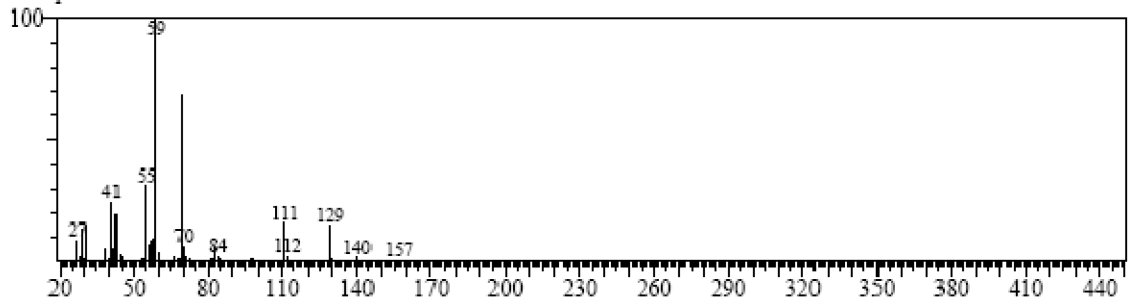
Line#:8 R.Time:21.933(Scan#:2393) Retention Index:0 MassPeaks:251
RawMode:Averaged 21.925-21.942(2392-2394) BasePeak:59.00(18729)
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



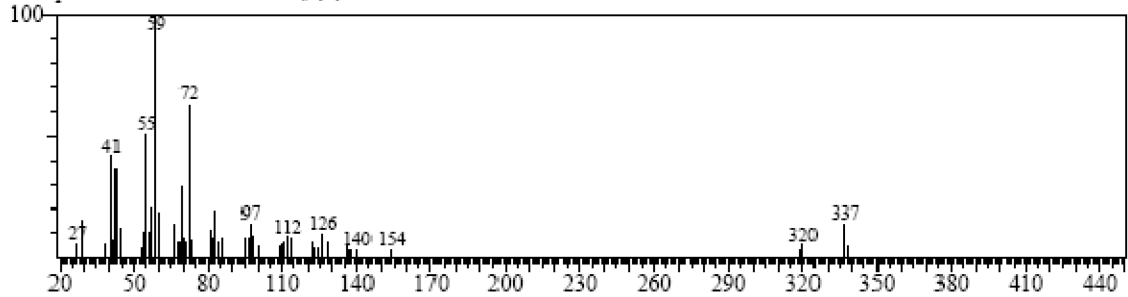
Hit#:1 Entry:63468 Library:WILEY7N2.LIB
SI:68 Formula:C10H22O CAS:1565-81-7 MolWeight:158 RetIndex:0
CompName:3-Decanol



Hit#:2 Entry:63469 Library:WILEY7N2.LIB
SI:67 Formula:C10H22O CAS:1565-81-7 MolWeight:158 RetIndex:0
CompName:3-Decanol



Hit#:3 Entry:327007 Library:WILEY7N2.LIB
SI:67 Formula:C22H43NO CAS:112-84-5 MolWeight:337 RetIndex:0
CompName:13-Docosenamide, (Z)-



Agitación magnética

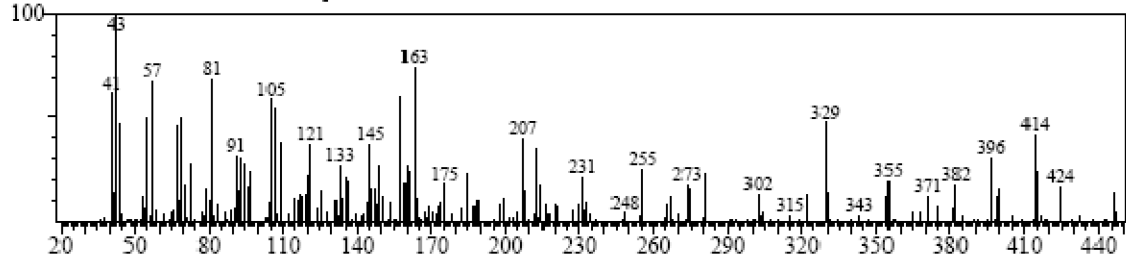
Espectro de masas del pico con Tr = 21,95 minutos

<< Target >>

Line#:12 R.Time:25.908(Scan#:2870) Retention Index:0! MassPeaks:277

RawMode:Averaged 25.900-25.917(2869-2871) BasePeak:42.95(9106)

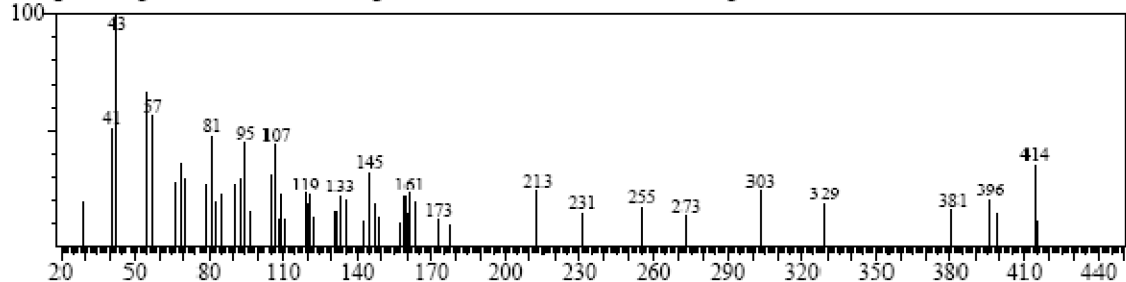
BG Mode:Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit#:1 Entry:388341 Library:WILEY7N2.LIB

SI:73 Formula:C₂₉H₅₀O CAS:83-47-6 MolWeight:414 RetIndex:0

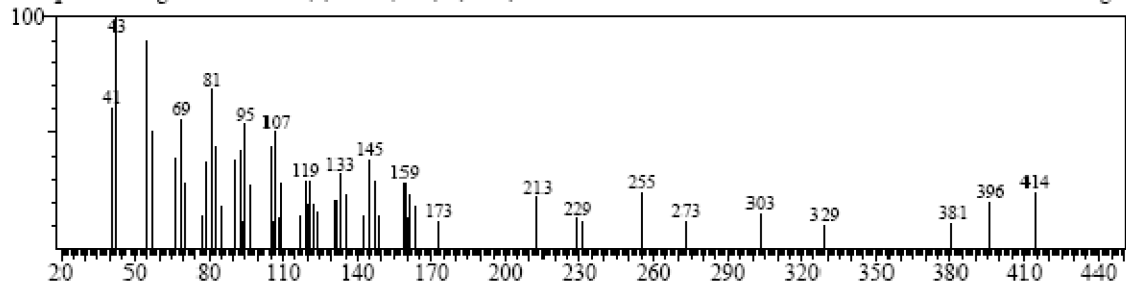
CompName:.gamma.-Sitosterol \$\$ Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- \$\$ Stigmast-5-en-3.beta.-ol, (24S)- \$\$ Clionaste



Hit#:2 Entry:388343 Library:WILEY7N2.LIB

SI:72 Formula:C₂₉H₅₀O CAS:83-47-6 MolWeight:414 RetIndex:0

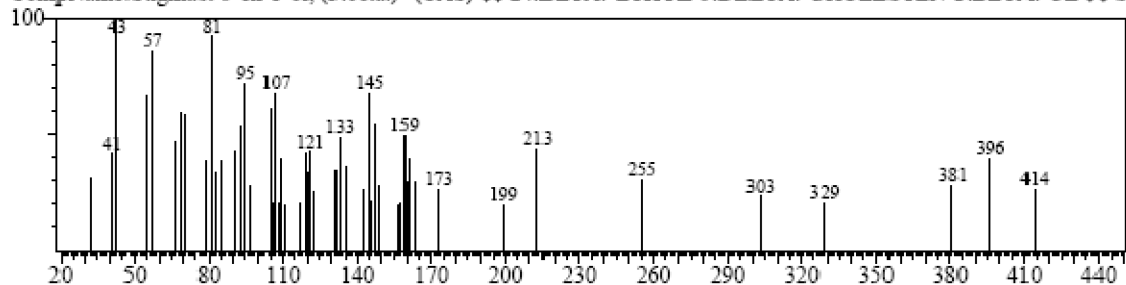
CompName:Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS) \$\$ Clionasterol \$\$ 24S-STIGMAST-5-EN-3.BETA.-OL \$\$.gar



Hit#:3 Entry:388331 Library:WILEY7N2.LIB

SI:70 Formula:C₂₉H₅₀O CAS:83-46-5 MolWeight:414 RetIndex:0

CompName:Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)- (CAS) \$\$ 24.BETA.-ETHYL-5.DELTA.-CHOLESTEN-3.BETA.-OL \$\$ S



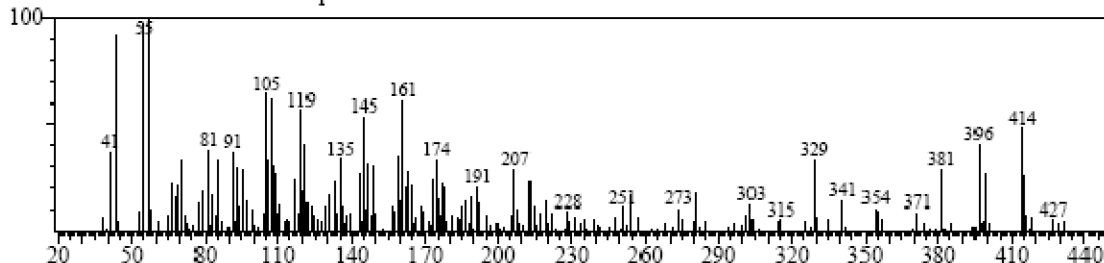
Ultrasonido

<< Target >>

Line# 9 R.Time: 25.908 (Scan#: 2870) Retention Index: 0! MassPeaks: 278

RawMode: Averaged 25.900-25.917 (2869-2871) BasePeak: 57.00 (15781)

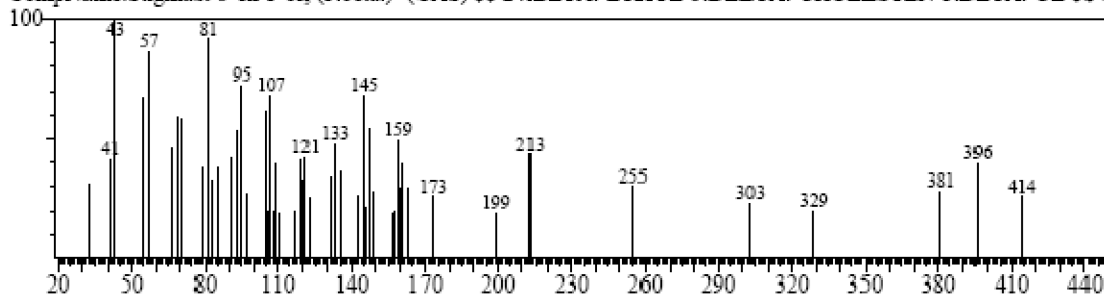
BG Mode: Calc. from Peak Group 1 - Event 1



Hit# 1 Entry: 388331 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 79 Formula: C₂₉H₅₀O CAS: 83-46-5 MolWeight: 414 RetIndex: 0

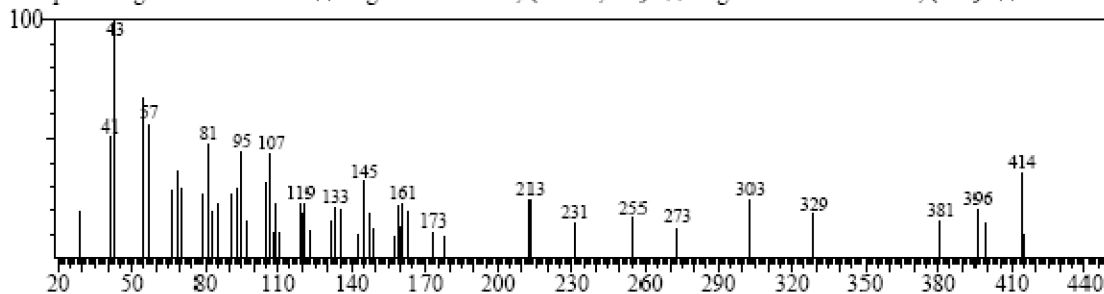
CompName: Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.)- (CAS) \$\$ 24.BETA.-ETHYL-5.DELTA.-CHOLESTEN-3.BETA.-OL \$\$ S



Hit# 2 Entry: 388341 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 78 Formula: C₂₉H₅₀O CAS: 83-47-6 MolWeight: 414 RetIndex: 0

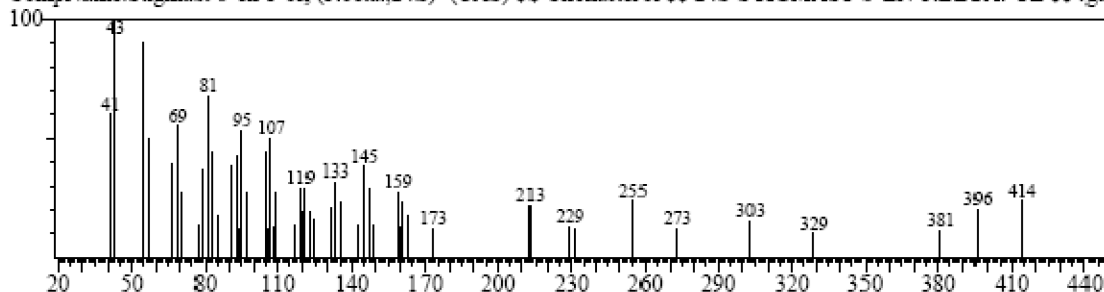
CompName: .gamma.-Sitosterol \$\$ Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- \$\$ Stigmast-5-en-3.beta.-ol, (24S)- \$\$ Cliona ste



Hit# 3 Entry: 388343 Library: WILEY7N2.LIB

SI: 77 Formula: C₂₉H₅₀O CAS: 83-47-6 MolWeight: 414 RetIndex: 0

CompName: Stigmast-5-en-3-ol, (3.beta.,24S)- (CAS) \$\$ Clonasterol \$\$ 24S-STIGMAST-5-EN-3.BETA.-OL \$\$.ga



Agitación Magnética

ANEXO 11. Cromatoplasas de la separación de los componentes del extracto en acetato de etilo obtenido por ultrasonido y agitación magnética

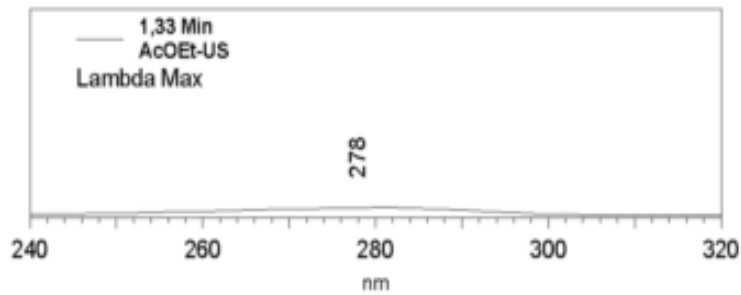


Extracto AcOEt-US

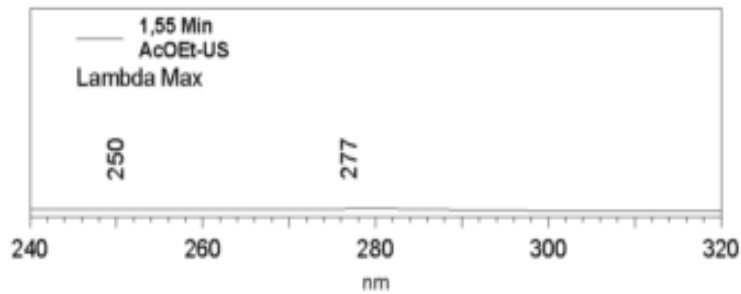


Extracto AcOEt-AG

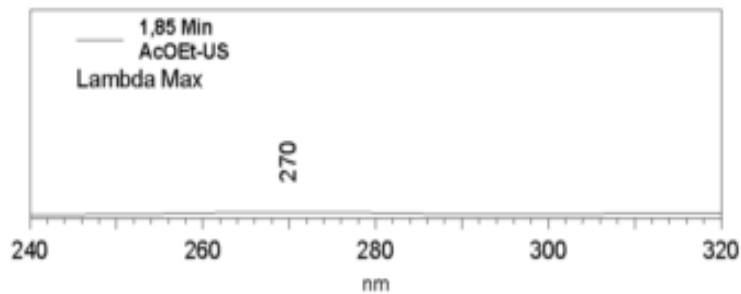
ANEXO 12. Espectros Ultravioleta de los picos encontrados en los extractos en acetato de etilo por ultrasonido y agitación magnética



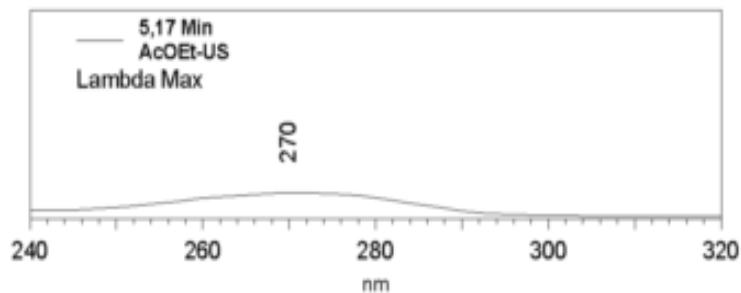
Retention time: 1,333 Min
Peak name:
Lambda max: 278, 390, 355



Retention time: 1,547 Min
Peak name:
Lambda max: 277, 250, 366

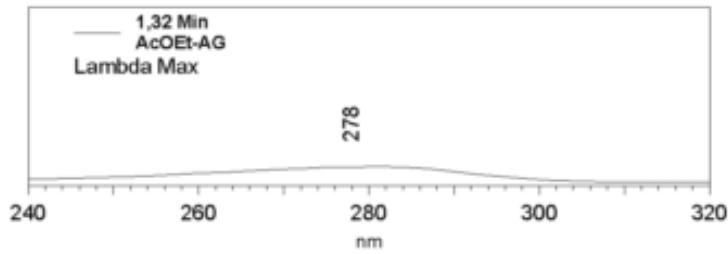


Retention time: 1,847 Min
Peak name:
Lambda max: 270, 324, 387

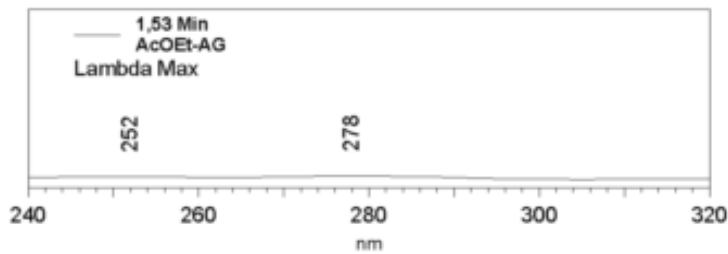


Retention time: 5,167 Min
Peak name:
Lambda max: 270, 393

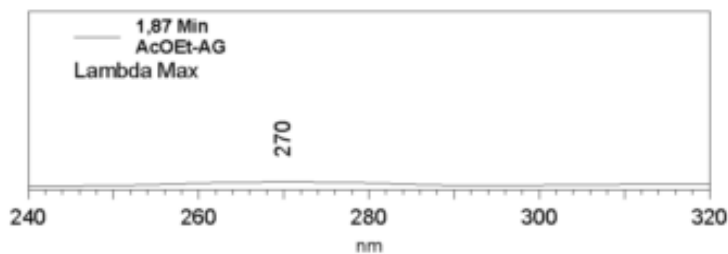
Ultrasonido



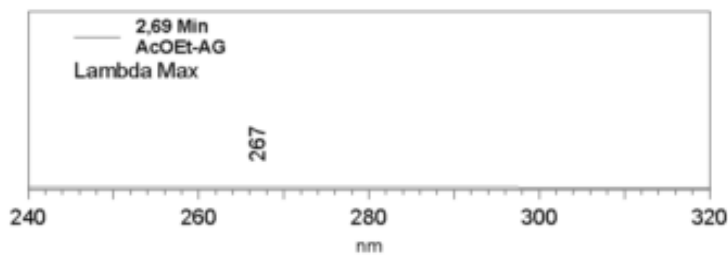
Retention time: 1,320 Min
Peak name:
Lambda max: 278, 391, 346



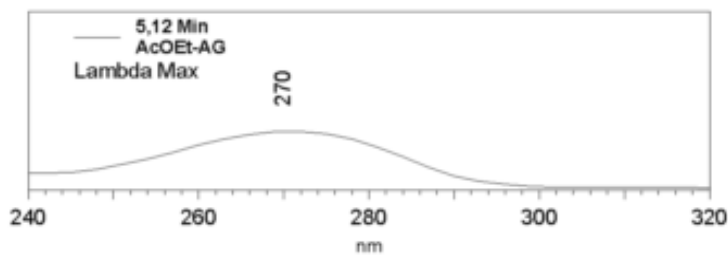
Retention time: 1,527 Min
Peak name:
Lambda max: 278, 252, 365



Retention time: 1,867 Min
Peak name:
Lambda max: 270, 324, 388



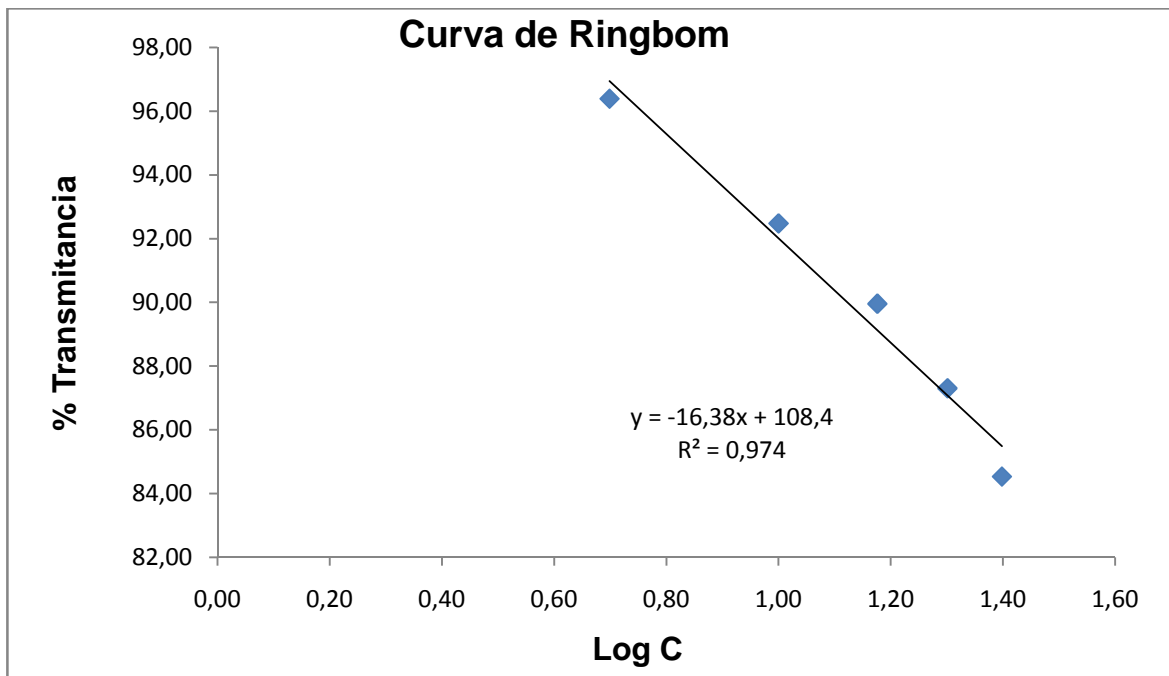
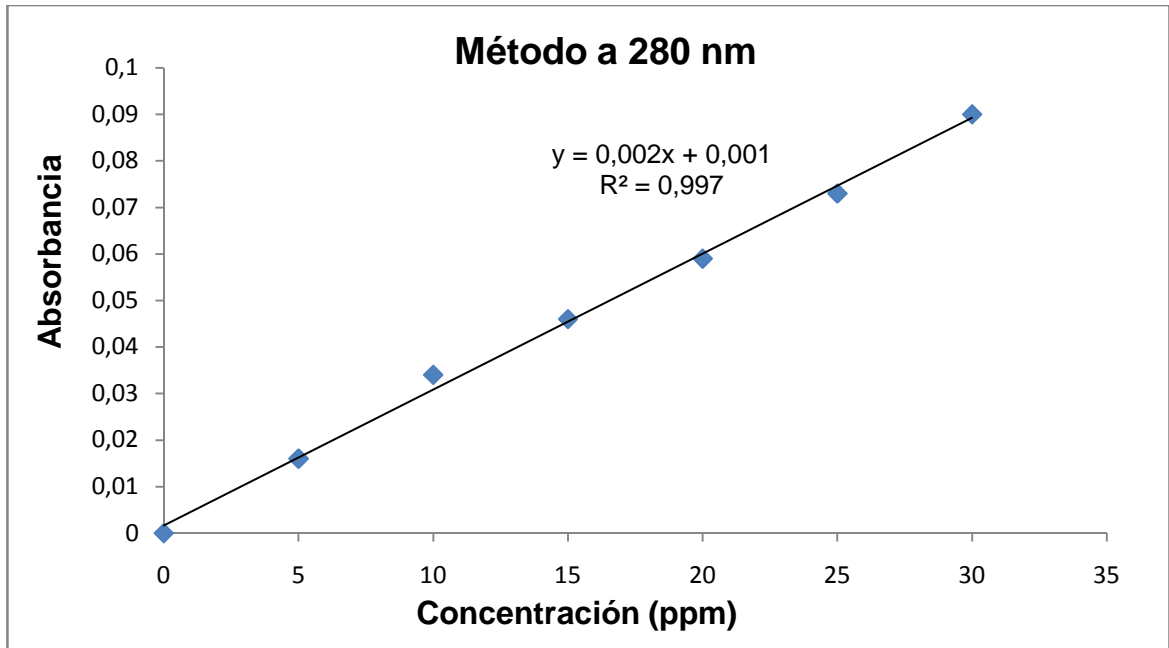
Retention time: 2,693 Min
Peak name:
Lambda max: 267



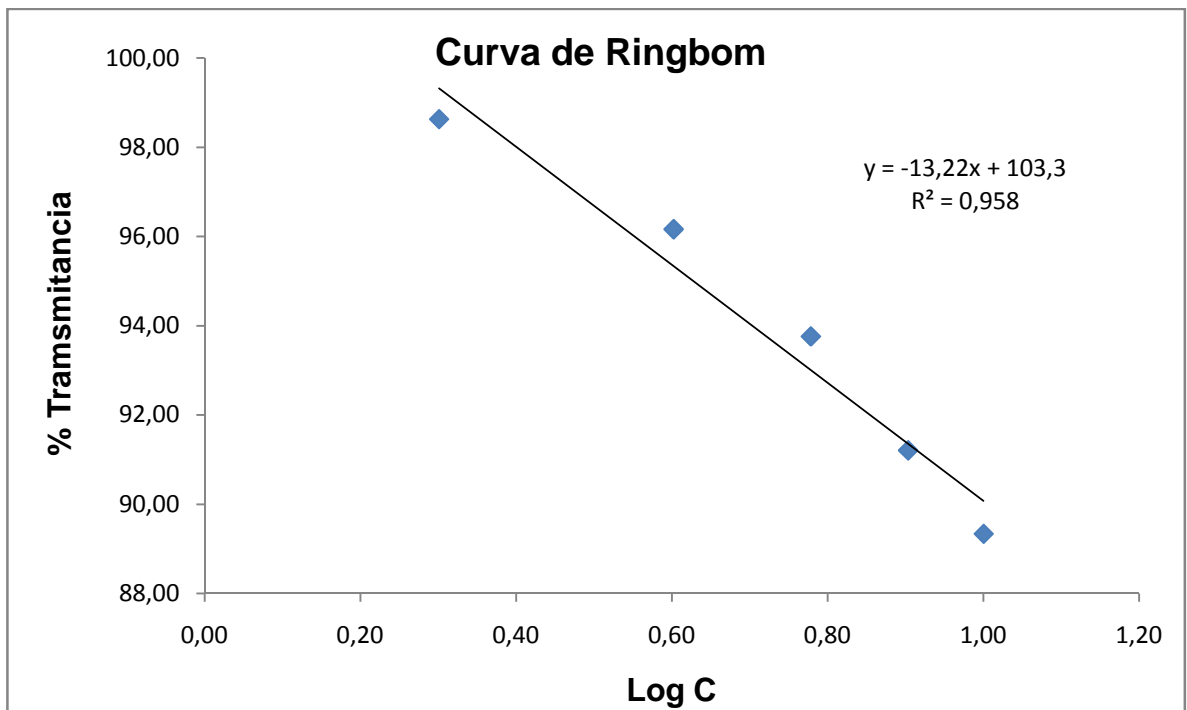
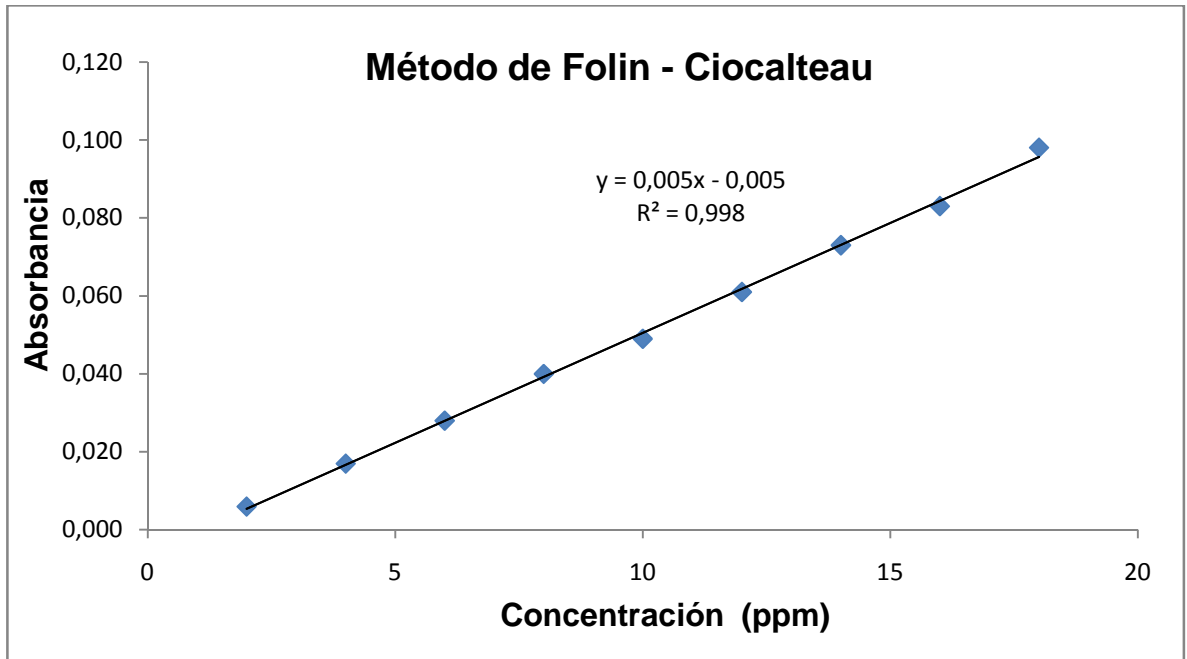
Retention time: 5,120 Min
Peak name:
Lambda max: 270, 370

Agitación Magnética

ANEXO 13. Curva de calibración y curva de ringbom para el método a 280 nm



ANEXO 14. Curva de calibración y curva de ringbom para el método de Folin-Ciocalteu



ANEXO 15. Medición del halo de inhibición (mm) para los extractos de cáscara de cacao frente a *Bacillus cereus* ATCC 11778

Extractos	Amoxicilina 5 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl₃-US	21	0	6	0	0
	21	0	7	0	0
	21	0	7	0	0
Promedio	21,0	0	6,7	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,58	0,00	0,00
CHCl₃-AG	21	0	8	6	0
	21	0	7	7	0
	21	0	7	7	0
Promedio	21,0	0	7,3	6,7	0,0
DS	0,00	0	0,58	0,58	0,00
AcOEt-US	21	0	0	0	0
	22	0	0	0	0
	22	0	0	0	0
Promedio	21,7	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,58	0	0,00	0,00	0,00
AcOEt-AG	22	0	0	0	0
	22	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,7	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,58	0	0,00	0,00	0,00
EXTUS	22	0	0	0	0
	22	0	0	0	0
	22	0	0	0	0
Promedio	22,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
EXTAG	21	0	0	0	0
	22	0	0	0	0
	22	0	0	0	0
Promedio	21,7	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,58	0	0,00	0,00	0,00

ANEXO 16. Porcentaje de inhibición de los extractos de cáscara de cacao frente a *Bacillus cereus* ATCC 11778

Extractos	Amoxicilina 5 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl ₃ -US	100	0	33,33%	0	0
CHCl ₃ -AG	100	0	34,90%	31,70%	0
AcOEt-US	100	0	0	0	0
AcOEt-AG	100	0	0	0	0

ANEXO 17. Medición del halo de inhibición (mm) para los extractos de cáscara de cacao frente a *Streptococcus agalactiae*

Extractos	Amoxicilina 5 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl₃-US	21	0	8	6	0
	21	0	7	6	0
	21	0	7	6	0
Promedio	21,0	0	7,3	6,0	0,0
DS	0,00	0	0,58	0,00	0,00
CHCl₃-AG	21	0	12	10	7
	21	0	11	10	6
	21	0	10	10	6
Promedio	21,0	0	11,0	10,0	6,3
DS	0,00	0	1	0,00	0,58
AcOEt-US	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
AcOEt-AG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,0	0	0,00	0,00	0,00
EXTUS	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
EXTAG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00

ANEXO 18. Porcentaje de inhibición de los extractos de cáscara de cacao frente a *Streptococcus agalactiae*

Extractos	Amoxicilina 5 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl ₃ -US	100	0	34,90%	28,60%	0
CHCl ₃ -AG	100	0	52,40%	47,60%	33,30%
AcOEt-US	100	0	0	0	0
AcOEt-AG	100	0	0	0	0

ANEXO 19. Medición del halo de inhibición (mm) para los extractos de cáscara de cacao frente a *E. coli aislada de pollo* resistente a amoxicilina

Extractos	Ciprofloxacina 0,125 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl₃-US	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Promedio	0,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
CHCl₃-AG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	6
	21	0	0	0	6
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0	0,00	0,0
AcOEt-US	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
AcOEt-AG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,0	0	0,00	0,00	0,00
EXTUS	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
EXTAG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00

ANEXO 20. Porcentaje de inhibición de los extractos de cáscara de cacao frente a *E. coli* aislada de pollo resistente a amoxicilina

Extractos	Ciprofloxacina 0,125 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl ₃ -US	100	0	0	0	0
CHCl ₃ -AG	100	0	0	0	0
AcOEt-US	100	0	0	0	0
AcOEt-AG	100	0	0	0	0

ANEXO 21. Medición del halo de inhibición (mm) para los extractos de cáscara de cacao frente a *Pseudomonas aeruginosa*

Extractos	Ampicilina 25 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl₃-US	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Promedio	0,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
CHCl₃-AG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	6
	21	0	0	0	6
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0	0,00	0,0
AcOEt-US	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
AcOEt-AG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,0	0	0,00	0,00	0,00
EXTUS	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
EXTAG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00

ANEXO 22. Porcentaje de inhibición de los extractos de cáscara de cacao frente a *Pseudomonas aeruginosa*

Extractos	Ampicilina 25 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl ₃ -US	100	0	0	0	0
CHCl ₃ -AG	100	0	0	0	0
AcOEt-US	100	0	0	0	0
AcOEt-AG	100	0	0	0	0

ANEXO 23. Medición del halo de inhibición (mm) para los extractos de cáscara de cacao frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Extractos	Ampicilina 25 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl₃-US	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
Promedio	0,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
CHCl₃-AG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	6
	21	0	0	0	6
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0	0,00	0,0
AcOEt-US	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
AcOEt-AG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,0	0	0,00	0,00	0,00
EXTUS	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00
EXTAG	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
	21	0	0	0	0
Promedio	21,0	0	0,0	0,0	0,0
DS	0,00	0	0,00	0,00	0,00

ANEXO 24. Porcentaje de inhibición de los extractos de cáscara de cacao frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Extractos	Ampicilina 25 mg/mL	Blanco DMSO 99%	100 mg/mL	50 mg/mL	25 mg/mL
CHCl ₃ -US	100	0	0	0	0
CHCl ₃ -AG	100	0	0	0	0
AcOEt-US	100	0	0	0	0
AcOEt-AG	100	0	0	0	0