



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“PRUEBAS *In vivo* USANDO RATAS WISTAR PARA EVALUAR
EL EFECTO HIPOLIPIDÉMICO DEL CACAO LIOFILIZADO
Y DETERMINACIÓN DE SU CONTENIDO ANTIOXIDANTE
MEDIANTE PRUEBAS *In vitro*”**

TESIS

PRESENTA:

p. QFB. DIANA JAZMÍN DUARTE MEDINA

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE

QUÍMICO-FARMACOBIOLOGO

ASESOR:

D.C. JOSÉ OCTAVIO RODILES LÓPEZ

MORELIA, MICHOACÁN, JULIO DEL 2016

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme la oportunidad de concluir uno de mis más grandes sueños.

A mis padres por incentivar en mí el deseo de formarme profesional y personalmente. Agradezco profundamente a mi madre Rosario Medina Ruiz por tu fortaleza, por darme las bases para ser un buen ser humano, por la paciencia y el amor incondicional que me has dado a lo largo de toda mi vida.

A mis hermanos Valentín, Esteban y Perla Duarte por acompañarme y ser mi más grande motor para salir adelante. Valentín no tengo palabras para expresar la gratitud que tengo contigo por toda tu ayuda a lo largo de este tiempo gracias hermano sin ti este sueño no hubiera podido realizarse.

A mis tías Carmen Ruiz, Silvia Ruiz por abrirme las puertas de su casa y acogerme como un miembro más de su familia, al igual que toda la familia Ruiz Ambriz.

A mis tías Medina Ruiz por el apoyo brindado no solo a mí si no a mis hermanos y mi madre. Tía Lina Medina gracias por brindarme y brindarle a mi familia apoyo incondicional y amor, le estaré profundamente agradecida toda la vida y reconozco en usted un ejemplo de Mujer tenaz y trabajadora.

A mis amigas, Xochitl, Xitlaly, Escarlette, Adriana, Karla, Maritza por acompañarme durante 5 años y formar parte de una gran etapa, gracias por regalarme cada momento de risas, por compartir los desvelos y la frustración, pero sobre todo por dejar huella en mi vida.

Al D.C. Octavio Rodiles, gracias por el tiempo, la paciencia y dedicación para conmigo y el proyecto. Gracias por brindarme herramientas para mi formación profesional, y por el entusiasmo y la alegría con que acepto ser mi asesor de tesis, es para mí un ejemplo de dedicación, trabajo y un gran ser humano.

Al D.C Héctor Martínez, Gracias por permitirme desde hace 2 años formar parte del grupo de trabajo en el laboratorio de Investigación y Desarrollo de Alimentos, por incentivar y cultivar mi interés por la investigación. Gracias por ser un gran mentor para mi formación profesional y personal, reconozco y admiro su trayectoria en la investigación y le considero un modelo a seguir como persona y como investigador.

A mis sinodales: M.C. Diana Cecilia Maya, gracias por formar parte de mi historia desde primer grado, por contribuir en mi desarrollo dentro de la facultad y estar siempre disponible para apoyarme la admiro y la considero no solo una gran profesional si no una gran mujer.

M.C. Rosy García, gracias por proporcionarme siempre su ayuda y disponibilidad del laboratorio de Análisis de Alimentos para cada determinación que lo necesité, también por aceptar y dedicar tiempo para formar parte de mi meza de sinodales.

M.C. Rafael Zamora Vega, gracias por aceptar ser parte de mis sinodales, por el esfuerzo para revisar mi tesis en contratiempo y por ser tan accesible con mi proyecto.

M.C. Ricardo Manivel gracias por aceptar ser mi sinodal y por formar parte de mi formación académica .

A la M.C. Eunice Tranquilino, gracias por instruirme durante todo el proyecto, por la paciencia y dedicación que brindaste al mismo, te considero una gran profesionalista y una gran persona y una amiga.

A la empresa SioSi Alimentos, gracias por su disposición y cooperación en este proyecto, sin la cual no hubiese sido posible.

Al grupo de trabajo del laboratorio (LIDA), Dra. Martha Estrella, Eréndira Valencia, Esther Tadeo, Gustavo Arévalo, Robert, Humberto, Julio y Osvaldo gracias por compartir este tiempo conmigo y por cada convivencia, por la motivación y el entusiasmo con que realizan su trabajo. A mi amigo Tomas Córdova por la orientación en este proceso de titulación.

A la UMSNH y la facultad de QFB por cada docente que fue parte de mi formación Gracias. Orgullosamente Nicolaíta

A la comunidad Messt, especialmente a las hermanas, Lucila Alcalá Pérez Médico Pediatra, C.P. Irma Gómez y Gisela Enríquez por sus oraciones y buenos deseos, tienen un lugar especial en mi corazón

A mi persona, por el empeño, la dedicación con que realizo mi trabajo, por mi tenacidad, siendo este proyecto el resultado de una meta establecida.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1. CACAO	1
1.1. Breve historia sobre el cacao	1
1.2. Clasificación botánica de <i>theobroma cacao</i> L.	3
1.3. Cultivo y distribución del árbol de cacao	6
1.4. Propiedades nutricionales del cacao	7
1.5. Etapas de procesamiento del grano de cacao	19
2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE	24
2.1. Radicales libres	24
2.2. Antioxidantes	24
2.3. Estrés oxidativo	25
3. SÍNDROME METABÓLICO	25
3.1. Beneficios de consumir chocolate	26
3.2. Actividad de agua	30
4. LIOFILIZACIÓN	30
4.1. Etapas de la Liofilización	32
4.2. Requerimientos del sistema de liofilización	33
4.3. Cacao liofilizado	34
II. JUSTIFICACIÓN	36
III. HIPÓTESIS	36
IV. OBJETIVOS	37
1. OBJETIVO GENERAL	37
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
V. MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. MATERIAS PRIMAS	38
2. INGREDIENTES PARA ELABORACIÓN DE DIETAS	38
3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA	39

3.1. Análisis bromatológico.....	39
3.2. Determinación de compuestos antioxidantes	42
4. ENSAYO BIOLÓGICO	43
4.1. Selección del Modelo Biológico	43
4.2. Manejo de animales de experimentación	43
4.3. Formulación de las dietas.....	45
4.4. Sacrificio y obtención de muestras biológicas	47
4.5. determinación de parámetros sanguíneos	48
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	49
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
1. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	50
1.1. Análisis bromatológico.....	50
1.2. Perfil de ácidos grasos	51
1.3. Compuestos antioxidantes	52
2. ENSAYO BIOLÓGICO	54
2.1. Formulación de las dietas.....	54
2.2. Consumo de alimento.....	55
2.3. PARÁMETROS SANGUÍNEOS.....	58
2.4. DETERMINACIONES EN HECES E HÍGADO	62
VII.CONCLUSIONES.....	66
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	68

ÍNDICE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Elaboración de la bebida <i>cacahuatl</i> . ⁵	2
Ilustración 2. Variedades de cacao. ⁸	4
Ilustración 3. Producción mundial de cacao. ³⁵	6
Ilustración 4. Distribución de los lípidos dentro de la semilla de cacao ⁸	9
Ilustración 5. Estructura del colesterol y β -sitosterol.	11
Ilustración 6. Posibles mecanismos de acción de los fitoesteroles. ²³	13
Ilustración 7. Estructura de los alcaloides cafeína y teobromina.	16
Ilustración 8. Estructura básica de los flavonoides, sin sustituyente ³²	16
Ilustración 9. Clasificación de los flavonoides ³³	17
Ilustración 10. Compuestos polifenólicos en cotiledones de semilla de cacao ³⁵	18
Ilustración 11. Productos de cacao	19
Ilustración 12. Fases de la fermentación de la semilla de cacao ³⁷	20
Ilustración 13. Cambios en la coloración del cotiledón durante la fermentación.	21
Ilustración 14. Puntas de cacao.	23
Ilustración 15. Cortado de la Fruta de Cacao.....	29
Ilustración 16. Isotherma de adsorción y desorción de los alimentos ⁴⁵	30
Ilustración 17. Punto Triple. ⁴⁶	31
Ilustración 18. Proceso de Liofilización. ⁴⁶	33
Ilustración 19. Liofilizador Industrial de Bandeja. ⁴⁷	34
Ilustración 20. Productos de cacao empleados en el estudio.	38
Ilustración 21. Material empleado para la determinación de humedad	40
Ilustración 22. Material empleado para la determinación de cenizas	40
Ilustración 23. Material empleado para la determinación de proteína	40
Ilustración 24. Material empleado para la determinación de lípidos.....	41
Ilustración 25. Material empleado para la determinación de fibra dietaría	41
Ilustración 26. Material para la determinación de compuestos antioxidantes	42
Ilustración 27. Ratas Wistar en sus jaulas individuales.	44
Ilustración 28. Bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH.	44
Ilustración 29. Antioxidantes en los diferentes productos de cacao	54
Ilustración 30. Gramos de alimento consumido por las ratas.....	57
Ilustración 31. Porcentaje final de ganancia de peso corporal en los animales.	57
Ilustración 32. Análisis de Lípidos sanguíneos en Animales	60
Ilustración 33. Otros Parámetros Sanguíneos en Animales	62
Ilustración 34. Apariencia física de los Hígados.....	64
Ilustración 35. Lípidos en heces e hígado.	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica del árbol de cacao. ⁶	3
Tabla 2. Variedades y descripción de las semillas de cacao. ⁹	5
Tabla 3. Componentes en 100 g de cacao en base seca. ²⁸	15
Tabla 4. Estudios relevantes del chocolate publicados desde el año 2000. ⁴²	26
Tabla 5. Materias Primas empleada en la elaboración de las dietas.	39
Tabla 6. Composición Dietas	46
Tabla 7. Métodos para determinaciones sanguíneas.	48
Tabla 8. Composición nutrimental de los diferentes productos de cacao.100 g	50
Tabla 9. Ácidos grasos por 100 g de aceite.	51
Tabla 10. Polifenoles Totales en los diferentes productos de cacao.	52
Tabla 11. Composición Nutricional de las Dietas.	55
Tabla 12. Consumo de alimento y peso corporal de los animales.	55
Tabla 13. Comparación de Lípidos entre Dieta de Referencia y Dieta Control	58
Tabla 14. Comparación de Lípidos en las Diferentes Dietas de Cacao.	58
Tabla 15. Otros Parámetros Sanguíneos.	61
Tabla 16. % de Lípidos en Heces y en Hígado	63

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
Aa	Actividad de agua
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín di fosfato
AE	Ácido esteárico
AGMI	Ácido graso monoinsaturado
AGPI	Ácido graso poliinsaturado
AGS	Ácido graso saturado
AL	Ácido linoleico
ALN	Ácido linolénico
AP	Ácido palmítico
AP-1	Factor de transcripción
CCHC	Cacao chocolate comercial
CFS	Cacao fermentado, secado al sol
CL	Cacao liofilizado
CPC	Cacao polvo comercial
ECV	Enfermedad cardiovascular
ERO	Especie reactiva de oxígeno
E-selectin	Endotelial eucocyte adhesion molecule -1
HDL	High density lipoprotein
ICAM-1	Intercelular adhesion molecule -1
LCAT	Lecitin Colesterol Acil Transferasa
LDL	Low density lipoprotein
LT	Leucotrienos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótidos fosfato
NO	Óxido nítrico
PA	Presión arterial
PGI-2	Prostaciclina
TG	Triglicérido
VCAM-1	Vascular cell adhesión molecule-1

RESUMEN

El chocolate es el derivado principal del cacao, y se ha considerado durante mucho tiempo como una exquisita golosina; sin embargo, estudios recientes demuestran que éste no solo es un alimento delicioso, y cuya utilidad principal es la repostería, además el chocolate elaborado con un alto porcentaje en cacao es fuente de antioxidantes, fibra, ácidos grasos esenciales de la familia omegas 6 y 9, nutrientes que lo potencializan como alimento funcional. Diversos estudios revelan que el consumo de cacao/chocolate provee antioxidantes que intervienen modulando la función plaquetaria e inflamación, y disminuyendo la presión arterial, aunque no existe un consenso sobre la cantidad óptima a consumir, puede sugerirse que el consumo diario de cacao es una buena elección para reducir, al menos parcialmente, el riesgo cardiovascular.

El objetivo de este proyecto fue determinar la composición química de Cacao Liofilizado (CL) proporcionado por la empresa SioSi Alimentos localizada en Morelia Michoacán y evaluar su efecto hipolipidémico, comparando el resultado con otros productos de cacao, empleando como modelo biológico ratas Wistar. Inicialmente, se realizó un análisis bromatológico del CL y los otros productos de cacao, también se efectuaron pruebas para determinar su capacidad antioxidante. Así mismo, las muestras de los diferentes productos de cacao se enviaron al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. para el análisis del perfil de ácidos grasos. Posteriormente, se formularon seis dietas: DR o dieta de referencia (animales sanos), DC o dieta control, alta en colesterol y triglicéridos, y cuatro dietas experimentales que incluyeron individualmente cada uno de los diferentes productos de cacao: CL, cacao fermentado secado al sol (CFS), cacao en polvo de marca comercial (CPC), cacao en chocolate de barra comercial con 90% de cacao (CCHC). Mediante un análisis estadístico se observó que existió una tendencia a disminuir los niveles de triglicéridos en un 40% en las dietas con CL y CFS. En el caso del colesterol (LDL) el CL obtuvo el mejor resultado con una disminución de 38%. Si bien el cacao sin procesar CL Y CFS obtuvo los mejores resultados, todos los grupos con dieta de los diferentes productos de cacao presentaron una disminución de lípidos con respecto al grupo control. El cacao liofilizado presentó uno de los mejores resultados tanto en el ensayo biológico como en su composición química, esto debido a que el proceso de deshidratación al que se sometió, liofilización, es un método de secado y conservación de alimento seguro, ya que preserva los nutrientes y propiedades funcionales de los alimentos, especialmente en aquellos alimentos con compuestos sensibles a la luz y el calor como el cacao.

Palabras clave: Cacao liofilizado, chocolate, colesterol total, triglicéridos, ratas wistar.

ABSTRACT

Chocolate is the main cocoa derived, and has been long considered an exquisite candy, however, recent studies show that this is not only a delicious food, whose main use is confectionery, the chocolate made with a high percentage of cocoa is a source of antioxidants, fiber, essential fatty acids type omegas 6 and 9, nutrients that potentiate it as functional food. Several studies show that consume cocoa / chocolate provides antioxidants that are involved in modulating platelet function, inflammation and lowering blood pressure, although there is no consensus of the optimum amount to consume, it can be suggested that daily consumption of cocoa is good choice to reduce, at least partially, cardiovascular risk.

The objective of this project was to determine the chemical composition of Freeze dried cocoa (CL) provided by the company SioSi Food located in Morelia Michoacán and evaluate their hypolipidemic effect, comparing the result with other cocoa products, using as a biological model Wistar rats. Initially, it has been made a compositional analysis of CL and the other cocoa products, tests were also conducted to determine their antioxidant capacity. Likewise, samples of different cocoa products were sent to the Center for Research and Assistance in Technology and Design of the State of Jalisco, A.C. for the analysis of fatty acids profile. Subsequently six diets were formulated: DR or reference diet (healthy animals), DC or control diet high in cholesterol and triglycerides, and four experimental diets that included individually each one the different cocoa products: CL, cocoa fermented sun dried (CFS), cocoa trademark powder (CPC), cocoa merchant bar chocolate with 90% cocoa (CHC). Through statistical analysis it was observed that there was a tendency to decrease triglyceride levels by 40% in diets with CL and CFS. In the case of cholesterol (LDL), CL obtained the best results with a decrease of 38%. While unprocessed cocoa CL and CFS obtained the best results, all diet groups with different cocoa products showed a lipid decrease with regard to the control group. The Freeze dried cocoa provided one of the best results in the chemical composition and bioassay, this because the dewatering process which is subjected, freeze-drying, is a method of drying and preserving food safe because it preserves the nutrients and functional properties of food; compared with other methods used to dehydrate the grain, where they can affect the functional properties, because some cocoa compounds are sensitive to heat and light.

Keywords: Freeze dried cocoa, chocolate, total cholesterol, triglyceride, wistar rats.

I. INTRODUCCIÓN

1. CACAO

Desde hace más de dos siglos, el cacao en grano (*Theobroma Cacao L*), se ha destacado como un alimento de gran importancia comercial en el ámbito mundial, ya que éste es utilizado como materia prima para la obtención de diversos productos como en confitería y bebidas, la industria cosmetológica y la farmacéutica. En los últimos años ha incrementado el interés por aquellos alimentos que cumplen no solo su función de nutrir, sino que también aportan un efecto positivo a la salud de aquellos que los consumen, de ahí el interés por conocer más sobre el cacao y sus posibles efectos.¹

Desde la antigüedad se ha atribuido al chocolate propiedades saludables que lo han aproximado más hacia un uso terapéutico que alimentario. El cacao/chocolate es fuente de fibra, antioxidantes, y ácidos grasos de las familias omega 6 y 9, compuestos que se ha observado intervienen en la disminución de colesterol LDL (lipoproteína de baja densidad) y triglicéridos (TG) en sangre, además de incrementar la actividad antioxidante. El estudio de la interacción de los componentes del chocolate es necesario para aportar información fundamental para los individuos “diana” que podrían beneficiarse del potencial efecto saludable del chocolate en el tratamiento cardiovascular.²

1.1. BREVE HISTORIA SOBRE EL CACAO

El nombre cacao deriva del término “cacahuatl” proveniente de las lenguas Mayas y Aztecas, y según el diccionario etimológico de Joan Corominas, se tomó del náhuatl kakáwa (radical de kakáwatl) que significa grano de cacao.³

El árbol del cacao, *Theobroma cacao L.* pertenece a la familia *Malvaceae* y es originario de Sudamérica, concretamente de los valles del Amazonas y Orinoco. Los primeros cultivadores del cacao se cree que fueron, o bien los olmecas, hace tres mil años, que ocupaban un área de selvas tropicales al sur de Veracruz (golfo de México), o bien los mayas, que hacia el siglo IV a.C. se habían establecido en una extensa región al sur del México actual.³

El nombre científico del cacao deriva del griego theós, dios, y bróma, alimento lo que significa alimento de los dioses, que concuerda con la leyenda Azteca que consideraba la semilla del cacao de origen divino. De acuerdo con esa leyenda el cacao era una bendición otorgada por sus dioses, quienes designaron a Quetzalcóatl como el portador del maravilloso presente. Se refiere que la bebida "Cacahuatl", que se hacía con los

granos de cacao curados y molidos, harina de maíz y chiles mezclados con agua caliente, era ofrecida a los dioses, y se preparaba en el calmécac y que sólo la bebían los nobles. Los españoles endulzaron esta mezcla sustituyendo el chile por azúcar y vainilla.³ Fue Hernán Cortés, quien a raíz de los banquetes organizados en su honor por Moctezuma II en los que probó el chocolatl, escribió a su rey Carlos I de España lo siguiente respecto del cacao: *"es un fruto como de almendras que venden molido y te niéndola en tanto, que se trata por moneda en toda la tierra y con ella se compran todas las cosas necesarias"*.⁴

El cacao se introdujo en Europa tras la colonización de América. En 1528 se realizó el primer embarco de semillas de cacao hacia España, pero no fue hasta finales del siglo XVI cuando empezó a consumirse en forma de chocolate. Inicialmente estaba reservado para el consumo de la clase social más alta, y en el siglo XVII el consumo de chocolate se extendió por Europa. De Europa se extendió a otros continentes como el africano donde llegó hacia principios del siglo XIX. Actualmente, es en este continente donde se encuentran los grandes productores de cacao, a nivel mundial.⁴



Ilustración 1. Elaboración de la bebida *cacahuatl*.⁵

1.2. CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE *Theobroma cacao* L.

Theobroma cacao L., es el nombre que recibe el árbol del cacao o cacaotero. Al nombre científico se le añade una "L.", que es la inicial del apellido del botánico sueco que clasificó la planta, Carl Von Linneo (1707-1778).¹⁴ El cacao es una especie diploide (20 cromosomas), y de ciclo vegetativo perenne. Linneo en 1753, primero ubicó el género *Theobroma* en la familia *Tiliaceae*. Después considero que podría ser incluido en la familia *Esterculiaceae*, y actualmente es incluido en la familia *Malvaceae*. *Theobroma cacao* es una de las 22 especies del género *Theobroma*. A continuación, la tabla 1 muestra la clasificación taxonómica del árbol de cacao.⁶

Tabla 1. Clasificación taxonómica del árbol de cacao.⁶

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	<u>Magnoliopsida</u>
Orden	Malvales
Familia	<u>Malvaceae</u>
Género	<i>Theobroma</i>
Especies	20-22

1.2.1. DESCRIPCIÓN DEL ÁRBOL DE CACAO

Este es un árbol de pequeña talla, perennifolio, de 4 a 7 m de altura (cultivado). Por otro lado, el cacao silvestre puede crecer hasta 20 m o más.⁷

- **Copa.** Baja, densa y extendida.
- **Hojas.** Grandes, alternas, colgantes, elípticas, de 20 a 35 cm de largo por 4 a 15 cm de ancho, de punta larga, ligeramente gruesas, margen liso, verde oscuro en el haz, y cuelgan de un pecíolo.
- **Tronco.** Este tiene un hábito de crecimiento di mórfico.
- **Ramas.** En abanico. Las ramas primarias se forman en verticilos terminales con 3 a 6 ramillas; al conjunto se le llama "molinillo". Es una especie cauliflora, es decir, las flores aparecen insertadas sobre el tronco o las viejas ramificaciones.
- **Corteza.** Externa de color castaño oscuro, agrietada, áspera y delgada. Interna y de color castaño claro.

- **Flor.** Se presentan muchas flores en racimos a lo largo del tronco y de las ramas, sostenidas por un pedicelo de 1 a 3 cm. La flor es de color rosa, púrpura y blanco, en forma de estrella.
- **Fruto.** El fruto es una baya grande comúnmente denominada "mazorca", carnosa, oblonga a ovada, amarilla o purpúrea, de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de grueso, puntiaguda y con camellones longitudinales; cada mazorca contiene en general entre 30 y 40 semillas incrustadas en una masa de pulpa desarrollada de las capas externas de la testa.
- **Semilla.** Semillas grandes del tamaño de una almendra, color chocolate o purpúreo, de 2 a 3 cm de largo y de sabor amargo. Están recubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco y de sabor dulce y acidulado.
- **Raíz.** El sistema radical se compone de una raíz pivotante que en condiciones favorables puede penetrar más de 2 m de profundidad, favoreciendo el reciclaje de nutrientes y de un extenso sistema superficial de raíces laterales distribuidas alrededor de 15 cm debajo de la superficie del suelo.
- **Sexualidad.** Hermafrodita.⁷

Todas las formas cultivadas están contenidas en la especie cacao, la cual ha sido dividida en 2 sub-especies: cacao y sphaerocarpum. Subespecie cacao: Está constituida por el tipo genético Criollo, el cual se caracteriza por tener frutos de forma alargada, de superficie rugosa, surcos profundos con 5 a 10 lomos, almendras ovoides o elipsoidales y cotiledones color blanco o rosado pálido. Subespecie sphaerocarpum: Los frutos de esta sub-especie son de forma elipsoide, de superficie lisa y surcos relativamente superficiales. Las almendras son de formas ovoides, aplanadas, cotiledones color violeta, y es conocida con el nombre de Forastero.⁸



Ilustración 2. Variedades de cacao.⁸

Tabla 2. Variedades y descripción de las semillas de cacao.⁹

Variedad de cacao	Origen	Descripción	Esquema
Criollo	En este grupo se encuentran las formas de Theobroma cacao subespecie cacao; y que crecen en el sureste de México y Centroamérica. Se consideran los primeros cacaos domesticados en las regiones cálidas húmedas donde se ubican asentamientos de la cultura mesoamericana.	Considerado de calidad superior, tiene excelentes cualidades aromáticas (olor dulce unido a un aroma delicado característico), más fino que el cacao Forastero. Este tipo de cacao posee un cotiledón de color entre marfil pardo y castaño muy claro.	
Forastero	Originario de las partes altas de la cuenca amazónica, producido mayormente en Brasil y África Occidental. Produce granos de pequeños a medianos, con un aroma perfumado, sabor amargo y un toque de acidez. Variedades del Forastero son el Amelonado, el Amazonas y el Arriba (único de alta calidad entre los Forasteros).	Posee cotiledones de color púrpura. Es capaz de tener una producción abundante, por lo que ha ido reemplazando al criollo, aunque su calidad es inferior. Estos granos conforman el mayor porcentaje de producción a nivel mundial. La fermentación de estas semillas es más lenta. Constituye la mayor parte del cacao ordinario.	
Trinitario	Se cree que esta es una población segregante, originada por el	Sus cotiledones abarcan desde el color blanco hasta el totalmente	

cruzamiento entre púrpura. Considerado de cacao forastero de mucho sabor y alta de Guyana y los criollos de calidad, aunque Venezuela, más posee menor tarde la cruce se rendimiento que el introdujo en la isla Forastero. Es más de Trinidad. Posee resistente que el notas mejoradas del Criollo. De este tipo del fuerte sabor del también se obtienen Forastero. cacaos aromáticos.



1.3. CULTIVO Y DISTRIBUCIÓN DEL ÁRBOL DE CACAO

El cultivo del cacao requiere condiciones climáticas apropiadas. Temperaturas entre 18 y 32°C, lluvias distribuidas a lo largo del año, con un rango de 1.000 a 4.000 mm/año, y una humedad del 70-80% durante el día y del 90-100% durante la noche. Estas condiciones mayoritariamente se encuentran en el área comprendida entre los trópicos de Cáncer y Capricornio (20° al Norte y Sur del Ecuador), como muestra la ilustración 3. En esta franja, existen tres grandes áreas productoras de cacao: África del Oeste, América Central y Sudamérica, y Asia, y de los cuales, ocho son los principales países productores: Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Nigeria, Camerún, Brasil, Ecuador y Malasia estos países representan ~90% de la producción mundial.⁹



Ilustración 3. Producción mundial de cacao.³⁵

La demanda mundial según la ICCO, ha pasado de 1.0 millón de toneladas a un estimado de 4.3 millones de toneladas durante el período 1961 - 2014, una tasa compuesta anual del 2.7 por ciento. De acuerdo con los pronósticos de la ICCO en el año 2014, los tres mayores países productores representan, en conjunto, aproximadamente el 70.7 % de la producción mundial de cacao, compuesto por Costa de Marfil (39.8 %), Ghana (21.1 %) e Indonesia (9.8 %). Otro 20 % es producido por los siguientes cuatro mayores productores: Brasil, Nigeria, Camerún y Ecuador, con cuotas de producción estimadas en 4.8, 5.5, 4.6 y 4.6 por ciento, respectivamente.¹⁰

En América latina se produce 12% del cacao mundial, especialmente en Brasil y Ecuador; sin embargo, Brasil, a pesar de ser productor, destina la mayor parte de su producción al consumo interno. En el caso de México, participa con menos del 2% de la producción mundial. En México, la producción de cacao se encuentra concentrada en 4 estados: Tabasco (70%), Chiapas (29%), Oaxaca y Guerrero (1.0%).¹¹

1.4. PROPIEDADES NUTRICIONALES DEL CACAO

El grano de cacao consta de una cáscara o cubierta (testa) que representa del 10 al 14 % del peso seco del cacao, y de una almendra (cotiledón) que constituye casi la totalidad del peso restante (86 a 90 %).¹²

Es un fruto con un buen aporte de nutrientes, como fibra, antioxidantes y omegas 6-9, considerados como potentes reductores de dislipidemias, además de proteínas, vitaminas y minerales necesarios en una alimentación saludable. Por otro lado, el cacao es abundante en compuestos volátiles, importantes componentes de sabor como son esteroides alifáticos, polifenoles, carbonilos aromáticos, diketopiperazinas, pirazinas y teobrominas.¹³

1.4.1. PROTEÍNAS

El cacao es fuente de aminoácidos esenciales siendo éstos: arginina, lisina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina, e histidina, en el caso de triptófano y metionina no se encuentran presentes, pero existen chocolates en polvo azucarados que los contienen pues se les ha añadido como parte de su protocolo de producción.¹³

El cacao contiene cerca de 18% de proteína constituido por cuatro tipos de proteínas: albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Las globulinas representan aproximadamente el 43% de la proteína total de la almendra.¹⁴

1.4.2. LÍPIDOS

El término general de lípido incluye a los triglicéridos, fosfolípidos, terpenos, esteroides, que comparten propiedades comunes, como ser insolubles en agua y solubles en compuestos orgánicos. Casi todas las grasas naturales consisten de 98 a 99% de triglicéridos, que a su vez están constituidos principalmente de ácidos grasos. El 1 o 2 % restante incluye huellas de mono diglicéridos y diglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y sustancias no saponificables que contienen esteroides. Un triglicérido está compuesto de tres ácidos grasos esterificados unidos a una molécula de glicerol. Los triglicéridos unidos al glicerol pueden variar en longitud de la cadena y el grado de saturación, y dependiendo de los ácidos grasos incorporados en el triglicérido el lípido puede ser duro o blando.¹⁵

A mayor contenido de ácidos grasos saturados mayor dureza. Las características de dureza de la manteca de cacao están relacionadas con los altos niveles de ácidos grasos saturados (AGS), razón por la cual estas mantecas son duras y firmes. Por otro lado, los niveles de ácidos grasos monoinsaturados en correlación con el grado de dureza de la manteca de cacao se relacionan con el grado de madurez de los frutos en diferentes épocas de cosecha.¹⁶

En el cacao, la grasa o manteca, es almacenada en los cotiledones, la cual puede constituir casi la mitad del peso de la semilla seca. Alrededor del 45% del peso de la semilla descascarillada y seca del grano de cacao corresponde a lípidos. La parte lipídica del cacao se designa como manteca de cacao. En esta fracción lipídica los ácidos grasos predominantes son mayoritariamente AGS; esteárico alrededor de 35% y palmítico con 25%; pero también contiene una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), representados por el ácido oleico con aproximadamente 35%; y también una pequeña cantidad de poliinsaturados (AGPI) en forma de linoleico (3%). Los niveles de ácidos grasos saturados oscilan entre 60 a 62 % y en los ácidos grasos insaturados entre 35 a 37%.²⁸ En la ilustración 4 se observa la distribución de lípidos en la semilla de cacao.¹⁶

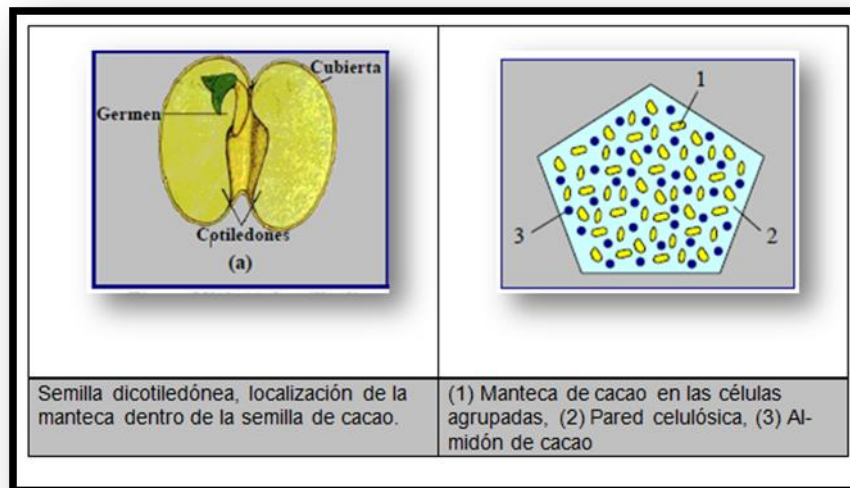


Ilustración 4. Distribución de los lípidos dentro de la semilla de cacao⁸

A. LÍPIDOS INSATURADOS PRESENTES EN CACAO Y EFECTOS EN LA SALUD

El ácido oleico es el ácido graso insaturado con mayor presencia en la manteca de cacao. Es un ácido graso omega 9 (18:1-n-9). El ácido oleico es el más abundante en la naturaleza y no es un ácido graso indispensable, ya que se puede bio-sintetizar a partir de precursores dietéticos como el ácido esteárico (18:0). Se encuentran presentes, aunque en porcentaje menor los ácidos grasos omega-3: α -linolénico, eicosapentaenoico (EPA) y omega-6 docosahexaenoico (DHA), y que estos ácidos grasos se consumen a través de la dieta ya que el cuerpo no puede sintetizar.^{17, 18}

En estudios metabólicos, tanto los ácidos grasos monoinsaturados como los ácidos grasos poliinsaturados (n-6 y n-3) reducen las concentraciones de colesterol total y LDL en plasma; los AGPI son algo más eficaces que los monoinsaturados. El único ácido graso monoinsaturado importante desde el punto de vista nutricional es el ácido oleico. Por otro lado, el ácido graso poliinsaturado más importante es el ácido linoleico, y ambos ácidos grasos se encuentran presentes en la semilla de cacao.¹⁸

Como se indicó antes, los ácidos grasos esenciales son indispensables porque el organismo no lo puede sintetizar, estos ácidos grasos esenciales tienen funciones importantes como precursores de prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, que son un grupo de compuestos tipo hormonas que participan en la regulación de la presión arte-

rial, frecuencia cardiaca, dilatación vascular, coagulación de la sangre, respuesta inmunológica y en el sistema nervioso central.¹⁹

B. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGPI

Los ácidos grasos que provienen de la dieta entran a los enterocitos por medio de una proteína localizada en la pared intestinal que transporta a los ácidos grasos. Los ácidos grasos con más de 14 carbonos, como es el caso del ácido linoleico (AL) y ácido linolénico (ALN), se esterifican para formar triglicéridos dentro del enterocito, y pasan a la circulación sanguínea a través de la vía linfática en forma de quilomicrones. La enzima lipoproteína lipasa (LPL), que se encuentra en la pared interna de los capilares sanguíneos hidroliza los triglicéridos presentes en las lipoproteínas de los quilomicrones liberando ácidos grasos, incluyendo AGPI. Los AGPI libres se incorporan en los triglicéridos del tejido adiposo e inhiben la expresión genética de enzimas involucradas en la lipogénesis; en el músculo incrementan la oxidación de ácidos grasos y reducen la acumulación de triglicéridos; en el hígado son incorporados a triglicéridos y suprimen la síntesis de lípidos y estimulan la oxidación de ácidos grasos.²⁰

C. EFECTOS DE LOS AGS DE LA MANTECA DE CACAO EN LA SALUD

La manteca de cacao es rica en ácido esteárico (AE) y ácido palmítico (AP), los cuales son de cadena larga saturada. El ácido esteárico tiene 18 átomos de carbono y el ácido palmítico contiene 16 átomos de carbono. Pese a ello, parece que el AE tiene poco efecto en las lipoproteínas plasmáticas. Acorde al Ministerio de Salud de los Estados Unidos, parece que el AE se comporta de manera diferente que otros AGS de cadena larga. El AE tiene un efecto neutro en los lípidos plasmáticos o las lipoproteínas plasmáticas (triglicéridos, colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL). Hay distintas teorías al respecto de los mecanismos causantes de dicho efecto neutro. Entre ellas predominan su menor absorción intestinal y su conversión endógena a ácido oleico, aunque se considera que no existe un solo mecanismo, sino una combinación de múltiples factores. Se requieren, por lo tanto, estudios de más larga duración para poder identificar el efecto de la ingesta de AE a largo plazo.²¹

En el caso del AP, segundo ácido graso saturado más abundante en la manteca de cacao, se ha encontrado que la mayor parte del mismo en los aceites vegetales se encuentra en las posiciones sn-1 y sn-3 del triacilglicerol, y en los aceites vegetales tienen solo un 5-20% del AP en la posición sn-2.2. El AP de los triglicéridos en la posición sn-1 y sn-3, al ser hidrolizado, forma AP libre. Los ácidos grasos saturados de cadena igual o superior a C18, y que ocupaban las posiciones sn-1 y sn-3 de los triglicéridos dieta-

rios no son fácilmente absorbidos debido a que, a la temperatura del lumen intestinal, se encuentran como sólidos o semi sólidos por su alto punto de fusión, superior a 37°C en la mayoría de ellos. Estos ácidos grasos van a reaccionar con iones divalentes, particularmente con el calcio, para formar jabones insolubles que no son ni emulsionados ni absorbidos y que serán posteriormente eliminados en las deposiciones.²³ Motivo por el cual es recomendable la adición de 2.25% de carbonato de calcio al chocolate para incrementar la excreción final de AP y AE, lo que reduce el colesterol LDL en sangre.²²

D. PRESENCIA DE ESTEROLES EN LA MANTECA DE CACAO

En la manteca de cacao hay pequeñas cantidades de esteroides, como el estigmasterol, campesterol, y principalmente β -sitosterol.³⁷ Este es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitoesteroides, y que se encuentran de forma natural en el reino vegetal. Estos fitoesteroides presentan una estructura química muy similar a la del colesterol, teniendo solamente en diferencia, un sustituyente metilo o etilo en su estructura y su importancia radica en esta similitud química con el colesterol, ya que se ha asociado su consumo con la reducción de niveles de colesterol en la sangre.²³

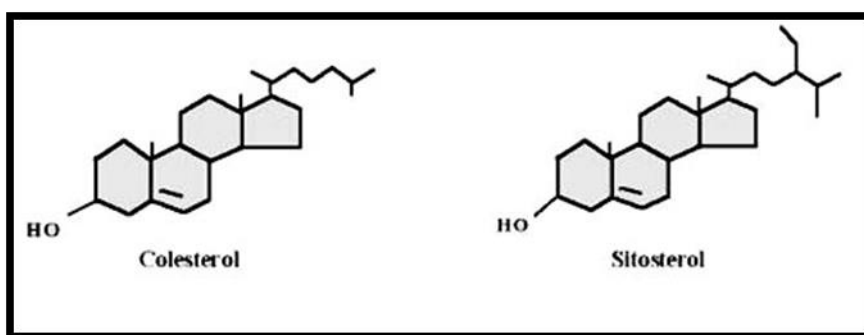


Ilustración 5. Estructura del colesterol y β -sitosterol.

E. EFECTO HIPOCOLESTEROLÉMICO DE LOS FITOESTEROLES

No está totalmente elucidado el mecanismo mediante el cual los fitoesteroides dietarios ejercen efectos hipocolesterolémicos. Sin embargo, basado en sus propiedades fisicoquímicas, se ha postulado que estas sustancias actúan a tres niveles diferentes:

- a) Inhiben la absorción intestinal del colesterol, tanto aquel de origen dietario como biliar.

- b) Inhiben la re-esterificación del colesterol a nivel de la actividad de la Lecitin Colesterol Acil Transferasa (LCAT).
- c) Aumentan la actividad y la expresión del transportador tipo ABC, acelerando el flujo de colesterol desde las células intestinales al lumen intestinal.

Debido a que los fitoesteroles son más lipofílicos que el propio colesterol, propiedad derivada de las características de mayor extensión y complejidad de la cadena lateral, los esteroides desplazarían competitivamente al colesterol desde la micela mixta formada por la acción de los fosfolípidos y de las sales biliares en el lumen intestinal. De esta forma, al tomar contacto la micela mixta con el ribete en cepillo formado por las microvellosidades de las células intestinales, los fitoesteroides ocuparían el lugar del colesterol. El colesterol no emulsionado (desplazado de la micela) no puede ser absorbido y es eliminado en las deposiciones.²³

Por su parte, los fitoesteroides presentan escasa absorción a nivel intestinal, por lo cual durante el proceso de transferencia de los ácidos grasos y mono glicéridos desde la micela a las células intestinales, produce el desensamblaje de la micela mixta, y los esteroides y estanoles se liberarían acompañando al colesterol no absorbido, siendo finalmente excretados con las deposiciones. Este constituiría el primer nivel de acción de los esteroides. La absorción intestinal de los fitoesteroides es extremadamente baja (menos del 0.5%-1%). Sin embargo, cuando estos esteroides son absorbidos, ejercerían una inhibición de la LCAT (segundo nivel de acción), con lo cual el colesterol no sería eficientemente re-esterificado e incorporado a los quilomicrones, estimulando así el eflujo hacia el lumen intestinal del colesterol no esterificado. Los esteroides producirían una sobre-expresión de los genes que codifican las proteínas de la estructura del transportador ABC, acelerando así el reflujo de colesterol (tercer nivel de acción).²³

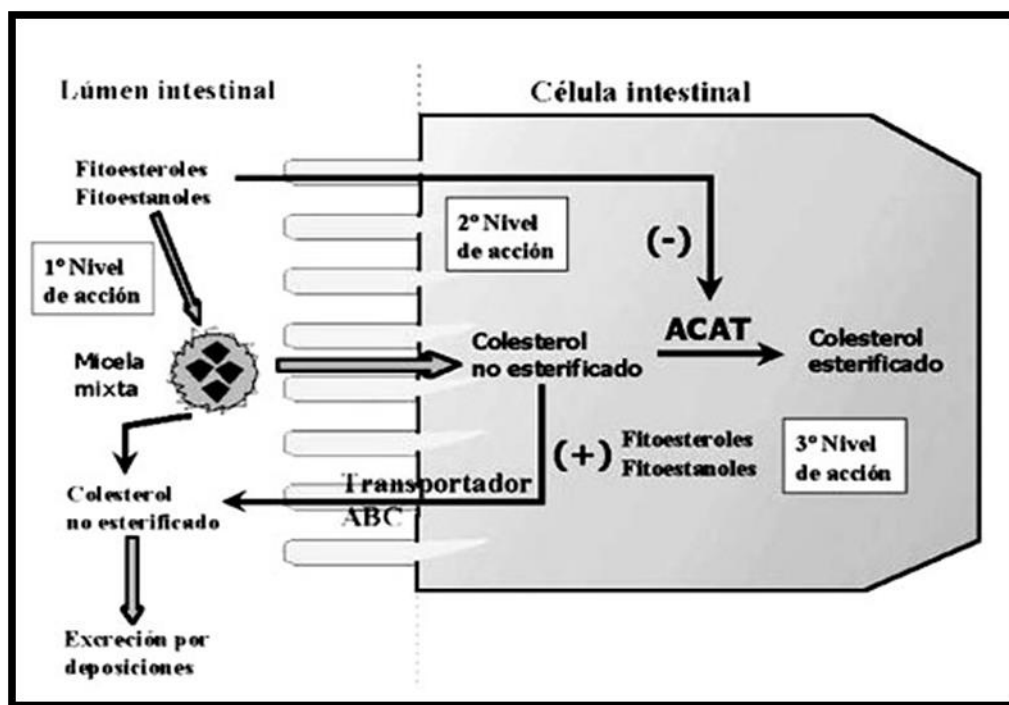


Ilustración 6. La figura resume los posibles mecanismos de acción de los fitoesteroides.²³

F. MECANISMO DE ACCIÓN DEL HDL COLESTEROL SOBRE ATEROSCLEROSIS

Diversos estudios demuestran que el consumo diario de chocolate rico en cacao aumenta los niveles de C-HDL en sangre. El C-HDL es conocido por ser protector contra las enfermedades cardiovasculares, extrae colesterol de las lesiones ateroscleróticas y lo transporta hasta el hígado para su posterior metabolismo y eliminación intestinal junto con las heces. El colesterol presente en nuestro organismo, se obtiene principalmente de dos fuentes: de la dieta (colesterol exógeno) y la síntesis endógena (colesterol endógeno). Prácticamente todos los tejidos que contienen células nucleadas son capaces de sintetizar colesterol. La fracción microsómica (retículo endoplásmico) del citosol es responsable de su síntesis. El C-HDL se produce en el hígado y en el intestino.²⁴

En el plasma, el C-HDL se convierte en un éster de colesterol por acción de la Éster de Colesterol Transferasa (LCAT). Mientras circula en el torrente sanguíneo, las partículas de C-HDL adquieren más colesterol del torrente sanguíneo. Además, las partículas de C-HDL van a eliminar el colesterol a través de un proceso de Transporte Inverso de Colesterol (TIC) desde los tejidos periféricos y de ateroma en las arterias hasta el hígado, llevando aproximadamente el 30% del colesterol sérico.²⁴

1.4.3. CARBOHIDRATOS

Las semillas de cacao están rodeadas por una pulpa aromática que procede de sus tegumentos. Estas fueron tempranamente reconocidas como una fuente rica de bioelementos. La pulpa mucilaginosa está compuesta por células esponjosas parenquimatosas que contienen células de savia ricas en azúcares (10 a 13%) como pentosas, glucosa, fructosa, sacarosa, además de pectina (1%).²⁵

1.4.4. FIBRA DIETARIA

Representan cerca del 12% de la semilla de cacao. Según la Asociación Americana de la Química de los Cereales, la fibra dietaria es conocida como los restos del esqueleto de las células vegetales no digeribles, y que son muy resistentes al hidrólisis por enzimas endógenas del sistema digestivo humano y a la digestión y absorción en el intestino delgado, y con una completa o parcial fermentación en el intestino grueso. Ésta incluye glúcidos, oligosacáridos, polisacáridos, ligninas y otras sustancias asociadas a los vegetales; y considerando componentes no estructurales como gomas, mucílagos y pectinas. La principal fuente de los componentes de fibra dietaria es la pared celular de la semilla de cacao y ésta presenta propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas debido a sus regiones amorfas y cristalinas. Las principales propiedades de pared celular son la hidratación, intercambio iónico y adsorción orgánica.²⁶

A. IMPORTANCIA Y USOS DE LA FIBRA DIETARIA

De acuerdo con estudios documentados, ahora se acepta que la fibra dietética juega un papel importante en la prevención de varias enfermedades, y que las dietas con un alto contenido de fibra, como aquellas que son ricas en cereales, frutas y verduras, tienen un efecto positivo en la salud, pues su consumo se ha relacionado con una menor incidencia de varios tipos de cáncer, enfermedades coronarias, diabetes y problemas digestivos.²⁷

B. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE ACEITE (CRA)

La capacidad de retención de aceite (CRA), es la máxima cantidad de aceite, en gramos, que puede ser retenida por gramo de material seco en presencia de un exceso de aceite bajo la acción de una fuerza. Es sabido que las partículas con gran superficie presentan mayor capacidad para absorber y atrapar componentes de naturaleza aceitosa; la grasa es atrapada en la superficie de la fibra principalmente por medios mecánicos. Se ha observado que las fibras insolubles presentan mayores valores de absorción

de grasa que las fibras solubles, y sirven a la vez como emulsificante. A esta propiedad se le relaciona con la composición química, el tamaño y el área de las partículas.²⁶

1.4.5. OTROS BIOELEMENTOS EN LA SEMILLA DE CACAO

Esta es fuente de vitaminas como niacina, riboflavina, tiamina, ácido ascórbico, piridoxina, nicotinamida, y ácido pantoténico; y también se encuentran presentes oligoelementos como calcio, fósforo y hierro.²⁸

Tabla 3. Componentes en 100 g de cacao en base seca.²⁸

Bioelemento	Contenido	Bioelemento	Contenido
Calorías	456	Nicotinamida	2.10 mg
Agua	3.6ml	Ácido pantoténico	1.35 mg
Proteína	12.0 g	Histidina	0.04-0.08 g
Grasa	46.3 g	Arginina	0.03-0.08 g
Carbohidratos	34.7 g	Treonina	0.14-0.84 g
Fibra	8.6 g	Serina	0.88-1.99 g
Glucosa	8-13 g	Acido glutámico	1.02-1.77 g
Sucrosa	0.4-0.9 g	Prolina	0.72-1.97 g
Calcio	106 mg	Glicina	0.09-0.35 g
Fósforo	537 mg	Alanina	1.04-3.61 g
Hierro	3.6 mg	Valina	0.57-2.60 g
Tiamina	0.17-0.24 mg	Lisina	0.08-0.56 g
Riboflavina	0.14-0.41 mg	Leucina	0.45-4.75 g
Niacina	1.7 mg	Isoleucina	0.56-1.68 g
Ácido ascórbico	3.0 mg	Tirosina	0.57-1.27 g
Piridoxina	0.9 mg	fenilalanina	0.56-3.36 g

A. METILXANTINAS

El cacao es rico en metilxantinas, principalmente cafeína (1,3,7-trimetilxantina) (0.25 a 1.5%), y teobromina (3,7-dimetilxantina) (0.5 a 2.7%). La teobromina es el alcaloide de base purina dominante en el cacao en grano, y se encuentra presente en el pericarpio joven y casi exclusivamente en los cotiledones de las semillas. La teobromina, es una sustancia alcaloidea, similar a la cafeína, cuya potencia como estimulante es 1/10

del efecto de la cafeína. Una porción típica de chocolate negro (40 g) contiene 2 a 11 mg de cafeína y 20 a 60 mg de teobromina, lo cual es una cantidad muy pequeña si se compara con el aporte de ambas sustancias a partir de café (137 mg de cafeína y 60 mg de teobromina por porción de aproximadamente 10 g).^{29,30}

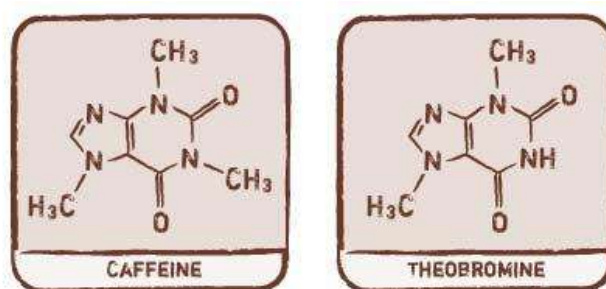


Ilustración 7. Estructura de los alcaloides cafeína y teobromina.

B. PIGMENTOS FENÓLICOS

Los pigmentos fenólicos son sustancias con uno o más anillos aromáticos y, al menos, un sustituyente hidroxilo. Existen dos grandes grupos: los ácidos fenólicos (benzoico y cinámicos) y los flavonoides (flavonoides, antocianinas y taninos). Los ácidos fenólicos tienen un solo anillo, mientras que los flavonoides tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico. Los pigmentos fenólicos reaccionan fácilmente con un ácido orgánico o un azúcar, como los flavonoides y las antocianinas, o entre sí para formar polímeros como los taninos.³¹

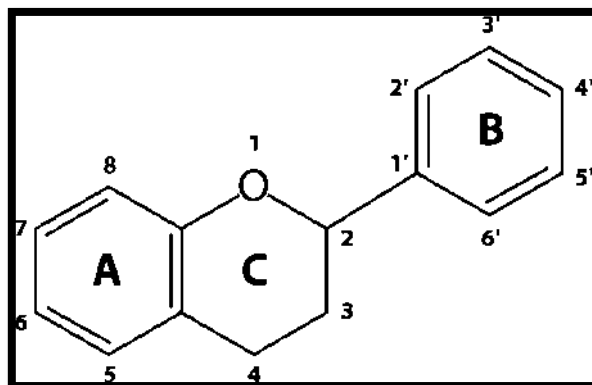


Ilustración 8. Estructura básica de los flavonoides, sin sustituyente³²

C. FLAVONOIDES

Estos polifenoles se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y son metabolitos secundarios de estas. Su clasificación se basa en las diferencias estructurales que presenta la cadena central. Estos compuestos están presentes en la semilla de cacao. Los distintos flavonoides pueden ser divididos en 4 clases: flavonas, flavanoles, flavanoles y antocianinas.³³

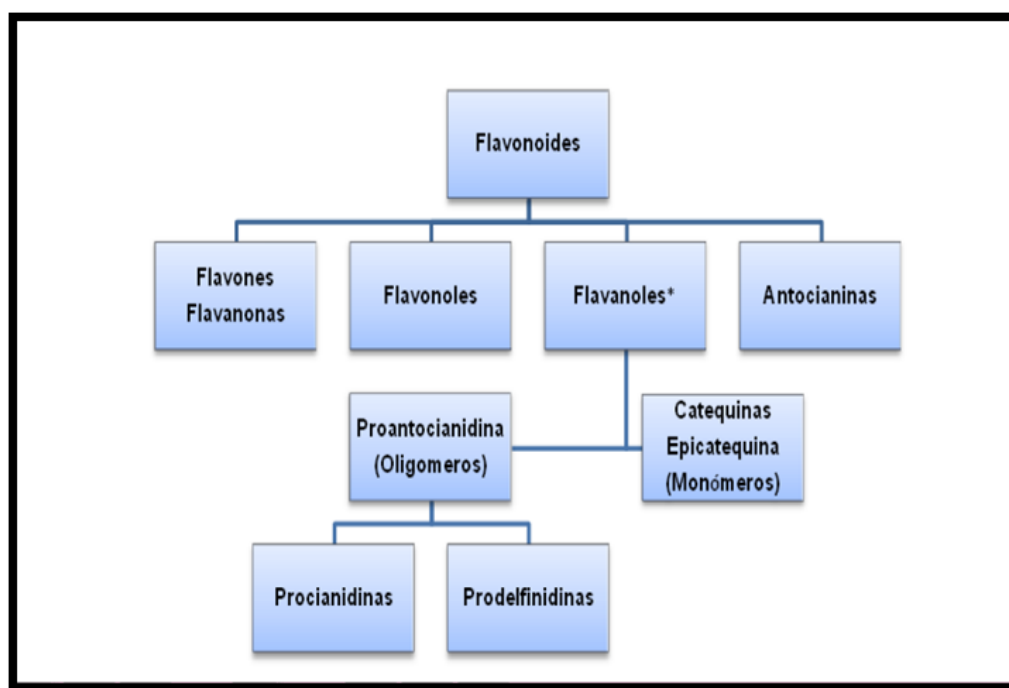


Ilustración 9. Clasificación de los flavonoides³³

D. POLIFENOLES Y ANTIOXIDANTES DE LA SEMILLA DE CACAO

El creciente interés sobre los polifenoles ha incentivado el estudio de su concentración natural en plantas y frutos y los factores que le impactan, debido en parte a sus propiedades funcionales como antioxidantes.

En la semilla de cacao los polifenoles se encuentran en la cáscara y en el cotiledón, el cual se caracteriza por el color violeta intenso, color relacionado con polifenoles específicos como las catequinas y antocianinas. Los polifenoles en la semilla de cacao constituyen aproximadamente entre el 8% y el 10% del peso seco de la semilla. Aunque en la semilla de cacao se encuentran diversos compuestos como se ilustra en la si-

guiente figura, los de interés son aquellos que pertenecen a los flavonoides (p.ej., catequinas).^{34,35}

<u>Compuesto</u>	(%) de compuestos polifenólicos en la célula almacenadora	(%) de compuestos polifenólicos en los cotiledones
Catequina	25,0	3,0
Proantocianidina	21,0	2,5
Polímeros de Proantocianidina	17,5	2,1
Antocianinas	3,0	0,4
Fenoles totales	66,5	8,0
Teobromina	14,0	1,7
Cafeína	0,5	0,1
Azúcares libres	1,6	-
Polisacáridos	3,0	-
Otros	14,4	-



Ilustración 10. Compuestos polifenólicos en cotiledones de semilla de cacao³⁵

Los polifenoles encontrados en el grano de cacao se almacenan en las células pigmentadoras de los cotiledones. Los grupos de polifenoles más abundantes son metabolitos tipo flavonoides, especialmente tres grupos básicos con un núcleo común tipo flavan-3,4-ol: catequinas, 37%, antocianinas, 4%, y pro-antocianidinas, 58 %. La principal catequina es la (-)-epicatequina que representa cerca del 30 % del contenido de polifenoles del grano, otras catequinas minoritarias son (+)-catequina, (+)-gallocatequina, y (-)-epigallocatequina.³⁵

E. FARMACOCINÉTICA DE LA EPICATEQUINA

Tras la administración oral, la mayoría de los flavonoides se metabolizan en el tracto gastrointestinal y se absorben, pasando a la sangre. Se ha demostrado en los seres humanos que, tras la ingestión de cacao en polvo, la epicatequina se absorbe por vía intestinal y es distribuido en forma metilada en sangre y como una variedad de conjugados antes de ser excretado en la orina.³⁶

1.5. ETAPAS DE PROCESAMIENTO DEL GRANO DE CACAO

El grano de cacao sufre una serie de procesos antes de obtener el producto terminado.



Ilustración 11. Productos de cacao

1.5.1. RECOLECCIÓN

La cosecha del cacao se realiza cortando las mazorcas maduras de los árboles, abriéndolas (normalmente con un cuchillo especial o machete), y extrayendo las semillas frescas rodeadas de una pulpa azucarada y mucilaginosa. El contenido de humedad en las semillas frescas está cerca del 65 %. ³⁷

1.5.2. FERMENTACIÓN

Las semillas frescas se dejan fermentar, con la finalidad de disolver la pulpa que las rodea, matar el germen y endurecerlas para evitar el ataque de mohos.

La fermentación básicamente es un proceso espontáneo de carácter bioquímico que se caracteriza por la sucesión progresiva de microorganismos (especies de hongos filamentosos, levaduras, bacterias ácidas lácticas y bacterias ácidas acéticas). Estos microorganismos son activados por el cambio de temperatura entre la masa en fermentación, proceso que dura un mínimo de 3 días y un máximo de 7 días, tiempo durante el cual los polifenoles se oxidan bajando su concentración inicial y provocan cambios en el

color de la semilla, relacionados con cambios en la concentración inicial de antocianinas. Los microorganismos encontrados en las semillas en fermentación son con frecuencia levaduras del género *Saccharomyces*, particularmente *S. cerevisiae*, además de *Candida krusei*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia fermentans*, *Hansenula anomala* y *Schizosaccharomyces pombe*, que provienen del medio ambiente circundante. Aunque ya se ha realizado la fermentación controlada, inoculando otras especies como las bacterias ácidas lácticas (*L. lactis* y *L. plantarum*) y bacterias de acetato (*Acetobacter aceti* y *Gluconobacter oxydans*) con similares resultados.²⁷

Este proceso de fermentado se realiza dentro de cajones de madera, y en ocasiones en cajas de plástico, pero puede realizarse envueltas en hojas de plátanos en el suelo. El tiempo de fermentado a la que se somete la semilla depende de la variedad de la semilla, en la variedad criollo, conocido como cacao fino, el fermentado se realiza por tres días, en las variedades forastero y los híbridos como trinitario, la fermentación es de siete días.^{37,38}

Cualquiera que sea el método empleado siempre se deberán realizar volteos periódicos y oportunos a la masa de semillas en fermentación, para que las fases anaeróbicas y aeróbicas que se desarrollan en los 3 primeros días realicen bien su función, y la semilla no finalice amarga posterior al proceso.³⁷

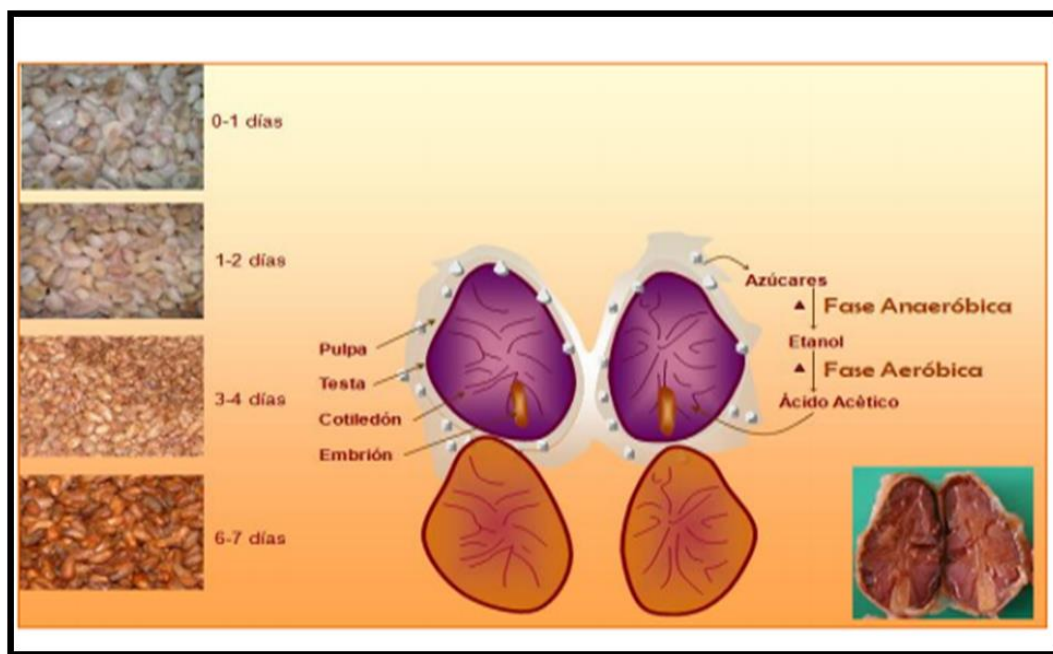


Ilustración 12. Fases de la fermentación de la semilla de cacao³⁷

1.5.3. SECADO

Luego de la fermentación, las semillas aun contienen mucha agua (55-60%), por lo que se realiza el tendido de éstas para secarlas, y colocándolas en patios o terrenos al sol durante aproximadamente una semana (o en secadores especiales), hasta reducir su humedad a un 7.5%, y así poder conservarlas, a la vez que se potencia el aroma y se disminuye el sabor amargo.

Al final del proceso los granos disminuyen hasta en una cuarta parte de su peso inicial y en las semillas cuyo proceso de fermentación fue correctamente realizado se evidencia la muerte del embrión, cambios de color en el cotiledón, y el desarrollo de hendiduras en el cotiledón, lo que puede observarse al realizar una prueba de corte para exponer el aspecto del cotiledón de la semilla, y como se observa en la siguiente ilustración.^{37, 38}

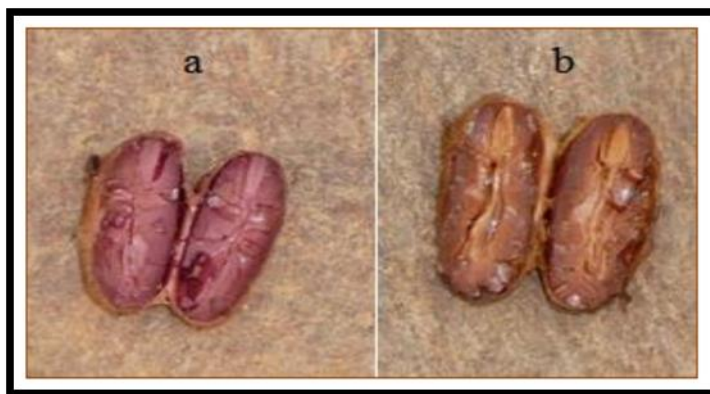


Ilustración 13. Cambios en la coloración del cotiledón durante la fermentación. Izquierda. Semilla no fermentada. Derecha. Semilla fermentada.¹⁵

1.5.4. LIMPIEZA

Después del secado, se realiza una limpieza a las semillas, con el objeto de eliminar los materiales extraños que puedan provenir de la recolección, tales como arena y piedras.^{37, 38}

1.5.5. TOSTADO

Se procede al tueste de las semillas, donde también se consigue el desarrollo del sabor y del aroma característico del chocolate. Su humedad se reduce hasta un 1-3 %, aproximadamente.

Durante el tostado el color del cacao sufre un pardeamiento adicional al observado durante las etapas previas de fermentación y secado. En este pardeamiento participan múltiples reacciones, como son oxidaciones y polimerizaciones de polifenoles, degradación de proteínas, y reacciones de Maillard. Así mismo, el cambio en aroma y sabor tiene especial influencia a las diferentes temperaturas y tiempos a la que sea sometida la semilla durante el tostado.

Para el tostado de la semilla de cacao existen dos alternativas; el tostado convencional, y el pre tostado. El tostado convencional consiste en el tueste de las semillas aun con cáscara en hornos industriales a temperaturas comprendidas entre 100 y 120 °C durante 20 a 30 aproximadamente. En cambio, el pre tostado, como su nombre lo indica, consiste en someter a las semillas a un tratamiento térmico previo a temperaturas inferiores de 100°C, por cortos periodos de tiempo (15 minutos) para desprender la cáscara de la semilla y posteriormente someterla de manera directa a otros niveles de temperatura o bien otros procesos.^{37,38}

1.5.6. DESCASCARILLADO

La fermentación, el secado y el tostado alteran la cáscara de las semillas, transformándola en una piel frágil, permitiendo que se rompan con mayor facilidad. Es así como luego del tostado se procede a la eliminación de las cáscaras, obteniéndose las semillas descascarilladas, también llamadas granos de cacao.^{37, 38}

1.5.7. TRITURACIÓN

Las semillas tostadas y descascarilladas se trituran para obtener un tamaño de grano más pequeño, usualmente llamados puntas de cacao.³⁷



Ilustración 14. Puntas de cacao.

1.5.8. MOLIENDA DE LAS PUNTAS DE CACAO

Al moler las puntas de cacao, las paredes celulares de las semillas se destruyen y el calor de fricción generado por la molienda funde la grasa, obteniéndose una pasta fluida conocida como pasta de cacao o licor de cacao (mezcla semi-plástica de partículas de cacao suspendidas en la manteca de cacao).

Una parte de este licor va a la producción de polvo y manteca de cacao, mientras que la otra parte se destina a la producción de chocolate con leche. A la pasta de cacao destinada a la producción de polvo y manteca de cacao se le puede aplicar un proceso de alcalinización opcional.^{37, 38}

1.5.9. EXTRACCIÓN

Luego, a este licor o pasta, se le aplica un procedimiento de extracción con el fin de extraer la manteca de cacao. El método más utilizado es mediante una prensa horizontal, con una presión de 5800-7250 psi. Después de la extracción por prensado, queda una masa sólida llamada torta de cacao, que normalmente contiene un 21-22 % de grasa residual, extrayendo aproximadamente el 41-42 % de la manteca de cacao. Para producir tortas con diferentes proporciones de grasa, el fabricante controla la cantidad de la manteca extraída a partir del licor.^{37, 38}

1.5.10. MOLIENDA Y PULVERIZADO DE LA TORTA DE CACAO

Finalmente, la torta de cacao es molida en pequeños pedazos y pulverizada para formar el cacao en polvo.^{37, 38}

2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

2.1. RADICALES LIBRES

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, señalado por un punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura bi-radical, muy reactiva, y tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, y que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Existen algunas circunstancias por las que también se producen radicales libres como son una dieta hipercalórica, y una dieta insuficiente en antioxidantes.³⁹

2.2. ANTIOXIDANTES

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química de transferencia de electrones de una molécula que pierde un electrón y por lo tanto se oxida a otra que gana el electrón y por lo tanto se reduce.

Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas, lípidos, proteínas y ADN. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos. Actúan como eliminadoras (Scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio pro-oxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la re-

posición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen.³⁹

2.3. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo se considera un factor importante en la génesis y progresión de los distintos desórdenes agrupados en el síndrome metabólico. Así, por ejemplo, se generan continuamente especies reactivas de oxígeno por sistemas enzimáticos como las NADPH oxidasas, que es la fuente principal de anión superóxido en las células del endotelio vascular.⁴⁰

La angiotensina II y las citoquinas inflamatorias aumentan la actividad de las NADPH oxidasas, y el anión superóxido producido reacciona con el óxido nítrico endotelial eliminando sus acciones vasodilatadoras, antitrombótica, y produciéndose además el potente oxidante peroxinitrito. Éste, a su vez, oxida las membranas celulares y también transfiere NO₂ al grupo 3 hidroxilo en las tirosinas de muchas proteínas, e inhibiendo su fosforilación y alterando su actividad. Como resultado se produce la activación de diversos factores de transcripción como AP-1 y NFκB, y que resulta en la mayor expresión de genes pro inflamatorios en el endotelio, incluyendo VCAM-1 (*vascular celladhesion molecule-1*), ICAM-1 (*intercelular adhesión molecule-1*) y E-selectin (*endotelial eukocyte adhesion molecule-1*).⁴⁰

Otro importante efecto de las especies reactivas de oxígeno es la oxidación de lípidos, y especialmente de las LDL. Las LDL oxidadas son mucho más aterogénicas que las LDL nativas, y entre sus muchos efectos nocivos se incluyen la inhibición de la expresión génica del óxido nítrico sintasa endotelial y la generación de especies reactivas de oxígeno en el endotelio vascular.⁴⁰

3. SÍNDROME METABÓLICO

Se denomina síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas constituidas por la elevación de las concentraciones de triglicéridos, el aumento de la presión arterial (PA) y la hiperglucemia. El síndrome metabólico se está convirtiendo en uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI, y asociado a un incremento de 5 veces en la prevalencia de diabetes tipo 2 y de 2-3 veces en la de enfermedad cardiovascular (ECV).⁴¹

Se considera que el síndrome metabólico es un elemento importante en la epidemia actual de diabetes y de ECV, de manera que se ha convertido en un problema de salud

pública importante en todo el mundo. La morbilidad y la mortalidad prematuras debidas a la ECV y la diabetes podrían desequilibrar completamente los presupuestos sanitarios de muchos países desarrollados o en vías de desarrollo.⁴¹

3.1. BENEFICIOS DE CONSUMIR CHOCOLATE

En la última década se han llevado a cabo diversos estudios clínicos y epidemiológicos en humanos que relacionan el consumo de chocolate con varios factores de riesgo cardiovascular. Como ejemplo, The Stockholm Heart Epidemiology Program, que incluyó una cohorte de 1,169 pacientes que habían padecido infarto agudo de miocardio a los que se le hizo un seguimiento durante 8 años. En él se relaciona de manera dosis-dependiente el consumo de chocolate con la reducción de la mortalidad coronaria. La tabla 4 resume los estudios de intervención con chocolate en humanos publicados desde el año 2000.⁴²

Tabla 4. Resumen. Estudios relevantes del chocolate publicados desde el año 2000.⁴²

CHOCOLATE	CHOCOLATE CONSUMIDO	SUJETOS	EFFECTOS	FUENTE
Chocolate negro rico en polifenoles. 20 g durante 2 semanas	500 mg/día de PF o 1,000 mg/día PF (18.99 mg y 37.98 mg respectivamente de catequinas)	14 adultos obesos o con sobrepeso	Reducción de presión sistólica y diastólica	Almoosawi y cols.2010
Chocolate negro, 1 barra 2 veces al día durante 4 semanas	180 mg de flavanoles por barra	49 adultos con colesterol elevado	Disminución del colesterol. Mejora de la presión arterial	Allen y cols.2008
Chocolate negro 20 g cada 3 días	No disponible	4 sujetos sanos	Reducción de los niveles de proteína C reactiva (CRP)	Di Giuseppe y cols.2008
Chocolate negro 100 g durante 15 días	No disponible	19 adultos hipertensos con baja tolerancia a la glucosa	Disminución de colesterol total y LDL. Disminución de la presión sistólica y diastólica	Grassi y cols.10 2008
Chocolate	Chocolate	45 voluntarios	Aumento de	Mursu y cols.26

negro y Chocolate negro con alto contenido en polifenoles 75 g diarios 3 semanas	negro: catequinas 365 mg en 100 g. Procianidinas 108 mg en 100 g Chocolate negro enriquecido: catequinas 556 mg/100 g. Procianidina 148 mg en 100 g	sanos	HDL sérico. Disminución de LDL	2004
Chocolate negro 100 g tras 1 hora de su consumo	No disponible	12 voluntarios sanos	Aumento de la capacidad antioxidante del plasma	Serafini y cols.2003
Chocolate rico en procianidinas 37 g tras 2 h y 6 h del consumo	Procianidina 4.0 mg/g de chocolate	10 adultos sanos	Aumento de prostaciclina. Disminución de leucotrienos Disminución de la activación plaquetaria. Efecto antiinflamatorio	Schramm y cols.2001

3.1.1. EFECTOS DEL CHOCOLATE SOBRE LA ATEROESCLEROSIS

El chocolate también puede influir en los niveles de leucotrienos y de prostaciclina. Los leucotrienos son potentes vasoconstrictores, agentes pro-inflamatorios y estimulantes de la agregación plaquetaria, mientras que la prostaciclina es un vasodilatador e inhibe la agregación plaquetaria. El consumo de chocolate con alto contenido de procianidina se demostró en una investigación y redujo significativamente los niveles de leucotrienos (29%) y aumento los niveles de la prostaciclina (32%).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que componentes del chocolate inhiben las vías de la lipoxigenasa, lo que da lugar a los leucotrienos pro-inflamatorios. Por otra parte, ensayos de alimentación múltiple de cacao han encontrado que el chocolate aumenta las HDL, y disminuye la PA.⁴²

3.1.2. EFECTO SOBRE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA E INFLAMACIÓN

Los flavonoides del cacao han mostrado tener efecto modulador sobre la función plaquetaria, reduciendo el riesgo de formación de trombos. El mecanismo de acción de los flavanoles ocurriría a nivel de la activación plaquetaria inducida por ADP y por epinefrina. Además, se ha observado que los flavanoles incrementan la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) en las células endoteliales.

Schramm, y colaboradores realizaron un estudio en 2001 donde observaron que el efecto del chocolate negro sobre la actividad plaquetaria puede ser secundario a los cambios en dos eicosanoides, metabolitos bioactivos del ácido araquidónico que median procesos inflamatorios. Así, los leucotrienos (LT) de la serie 4 disminuyen y la prostaciclina (PGI₂) se incrementa tras el consumo de chocolate negro, lo que se considera un cambio favorable para la protección cardiovascular.

Para obtener resultados significativos en la disminución de la presión arterial, el consumo de chocolate tendría que ser crónico, bastaría con 6-10 g diarios, o bien agudo, 20-100 g durante 15 días. Sin embargo, el consumo de chocolate blanco no presentaría dichos efectos.⁴²

3.1.3. PÉRDIDA DE NUTRIENTES DURANTE POST COSECHA

Las concentraciones de antioxidantes que se encuentran en la semilla de cacao dependen de varios factores, pero principalmente de los procesos post cosecha a la que es sometida la semilla durante la elaboración de derivados.^{43,44}

Las etapas en las que más daño puede presentar el grano de cacao son durante la fermentación, secado, y tostado de la semilla. Aunque en la concentración de polifenoles de la semilla de cacao tiene influencia el estado de madurez fisiológico del árbol, y el origen del cultivo (convencional o ecológico).^{43,44}

El proceso de fermentado inicia con la extracción de la semilla, para ello se parte el fruto con objetos de madera como se muestra en la ilustración 15, procurando no hacer daño a las semillas durante este proceso. Cuando se parte el fruto con herramientas no apropiadas al propósito (p. ej., el machete), es casi imposible medir la fuerza necesaria para partir únicamente el fruto sin dañar la semilla y comprometer el efecto del proceso de fermentado en la semilla.⁴³



Ilustración 15. Cortado de la Fruta de Cacao.

Troceado de la fruta de cacao apropiado para extracción de las semillas (Izq).
Troceado de la fruta de cacao no apropiado para extracción de las semillas (Der).

La temperatura y la exposición a luz solar es el principal factor para la pérdida de polifenoles, se han registrado temperaturas en las semillas en fermentación de hasta 30 °C el primer día y de 50 °C a los 7 días; y tomando en cuenta que la descomposición de los fenoles inicia aproximadamente a los 50°C. Además, la pérdida continúa con la exposición de la semilla al secado, el cual puede ser en hornos calentados de diversas formas o al sol, y mencionando que los compuestos fenólicos son fotosensibles.⁴³

Autores han registrado que durante la etapa de fermentación la pérdida de polifenoles totales decrece de su estado inicial a un 35% al tercer día, y un 59% hasta el séptimo día de fermentación. Estas pérdidas se acentúan ligeramente durante el secado, donde las diferencias son marcadas por el sistema empleado. Se verificó que las semillas fermentadas por 3 días presentaron pérdidas de 19% secadas en estufa y 11% secadas al sol y que las semillas fermentadas por 7 días presentaron pérdidas de 12% secados en estufa y un 3% secado al sol.⁴³

De igual manera se han reportado pérdida de proteínas durante la fermentación, y éstas alcanzaron su nivel más alto de pérdidas al tercer día de iniciado la fermentación, cuando registra hasta un 57% de pérdidas totales.⁴³

Lo anterior es muy importante porque la semilla de cacao una vez fermentada y tostada, es la principal materia prima en la elaboración de derivados de gran consumo en el mundo, como el chocolate o bien el polvo de cacao, que por el valor retenido de polifenoles o proteínas totales en la semilla podría determinar si dará origen a una deliciosa golosina o un alimento funcional.⁴³

3.2. ACTIVIDAD DE AGUA

El agua libre influye de diversas formas en la reología, la textura, la estabilidad microbiana y las reacciones químicas y enzimáticas ya que el agua ligada no actúa pues no está disponible o permanece inmóvil. El agua libre es la que da origen al término de actividad de agua (Aa) y es en base a este parámetro y no en el contenido total de agua, que se puede predecir la estabilidad y la vida útil de un producto. La actividad de agua es una propiedad intrínseca y se relaciona de manera no lineal con el contenido de humedad mediante isothermas de adsorción y desorción. La isoterma de adsorción representa la cinética con la que un alimento adsorbe humedad y se hidrata y es importante conocerla ya que refleja el comportamiento de los deshidratados almacenados en atmosferas húmedas (higroscopicidad), de manera semejante al de desorción equivale al proceso de deshidratación y refleja la forma como pierde agua. Con base en ambas curvas se diseñan los sistemas de almacenamiento, de secado, de rehidratación, además de que ayuda a predecir la estabilidad de los alimentos.⁴⁵

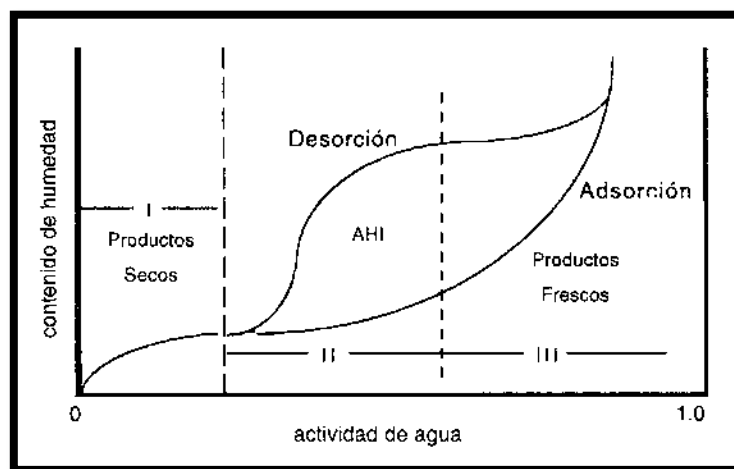


Ilustración 16. Isotherma de adsorción y desorción de los alimentos⁴⁵

4. LIOFILIZACIÓN

La liofilización es un método de conservación de alimentos basado en la disminución de la actividad de agua por sublimación para prolongar la vida de anaquel y mantener las propiedades organolépticas, componentes volátiles y/o termo-sensibles. Además,

reduce el peso y el volumen, lo cual facilita el transporte y el almacenamiento de los alimentos. Una sustancia pura puede existir como sólido, líquido o gas y puede cambiar de estado por medio de un proceso en el cual libera o absorbe calor a temperatura constante (calor latente), de esto depende hacia donde se direcciona dicho cambio.⁴⁶

El cambio de fase de sólido a gas, sublimación, debe realizarse en condiciones de presión y temperatura menores a las del punto triple (punto en el que conviven los tres estados de la materia), ya que por debajo de éste no existe la fase líquida. En el caso del agua el punto triple se encuentra a 4.58 Torr (0.006 atm) y 0°C (273.15°K). Por ejemplo, si se tiene agua congelada, al someterla a una presión menor a la del punto triple, el hielo sublima.⁴⁶

La más importante característica a resaltar de esta operación es la excelente calidad de sus productos, debido principalmente a la gran cantidad de agua removida, la baja degradación térmica, la retención de materiales volátiles responsables del aroma y del sabor, y la estructura rígida del material seco. La rigidez de la estructura del material seco que le da el congelamiento es importante para prevenir colapsos de la matriz sólida después del secado, y esta rigidez da origen a otra característica importante de la liofilización, la cual es la fácil rehidratación y reconstrucción original de los productos secos, debido principalmente al bajo grado de rompimiento celular y estructural.⁴⁶

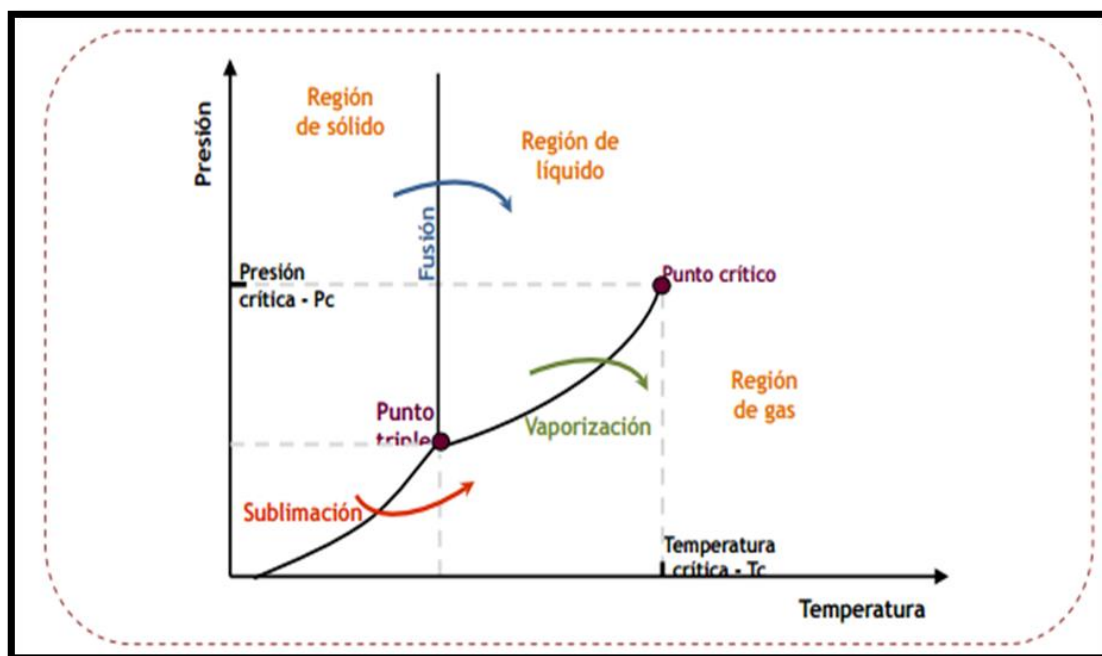


Ilustración 17. Punto Triple.⁴⁶

4.1. ETAPAS DE LA LIOFILIZACIÓN

El proceso de liofilización consta principalmente de cuatro etapas las cuales se describen a continuación:

PREPARACIÓN: Antes de comenzar el proceso, es fundamental el acondicionamiento de la materia prima, ya que los productos liofilizados no pueden ser manipulados una vez completado el proceso. En esta etapa se prepara el producto para el proceso de sublimación, incluye, limpieza de la materia prima, y en el caso de los líquidos se concentran previamente con el fin de bajar el contenido de agua, lo que acelera el proceso de liofilización.

CONGELAMIENTO. La segunda etapa se lleva a cabo en congeladores independientes (separados del equipo liofilizador) o en el mismo equipo. El objetivo es congelar el agua libre del producto. Para ello se trabaja a temperaturas entre -20 y -40°C . Para la optimización de este proceso es fundamental conocer y controlar:

- La temperatura en la que ocurre la máxima solidificación.
- La velocidad óptima de enfriamiento.
- La temperatura mínima de fusión incipiente.

SECADO PRIMARIO O SECADO POR SUBLIMACIÓN. La tercera etapa del proceso consiste en la desecación primaria del producto, por sublimación del solvente congelado (agua en la mayoría de los casos). Para este cambio de fase es necesario reducir la presión en el interior de la cámara, mediante una bomba de vacío, y aplicar calor al producto. Esto último se puede hacer mediante conducción, radiación o fuente de microondas. Los dos primeros se utilizan comercialmente combinándose su efecto al colocarse el producto en bandejas sobre placas calefactoras separadas una distancia bien definida.

SECADO SECUNDARIO. La cuarta etapa del proceso de liofilización se trata de la desecación secundaria del producto por medio de desorción. Esta consiste en evaporar el agua no congelable, o agua ligada, que se encuentra en los alimentos; logrando que el porcentaje de humedad final sea menor al 2%. Como en este punto no existe agua libre, la temperatura de las bandejas puede subir sin riesgo de que se produzca fusión. Sin embargo, en esta etapa la presión disminuye al mínimo, por lo que se realiza a la máxima capacidad de vacío que pueda alcanzar el equipo. Es importante, finalmente,

controlar el contenido final de humedad del producto, de manera que se corresponda con el exigido para garantizar su estabilidad.⁴⁶

La ventaja de esta estructura es que permite una rápida rehidratación, no obstante, es frágil por lo que requiere de una protección que prevenga los posibles daños ocasionados por una inadecuada manipulación. Asimismo, debido a la porosidad de dicha estructura es necesario realizar el empaque del producto de forma tal que se evite la penetración de oxígeno, a fin de impedir procesos oxidativos sobre los lípidos, y también debe controlarse la humedad, ya que esta provocaría la rehidratación y descomposición del producto terminado.⁴⁶



Ilustración 18. Proceso de Liofilización.⁴⁶

4.2. REQUERIMIENTOS DEL SISTEMA DE LIOFILIZACIÓN

Los requerimientos básicos de un sistema de liofilización se consideran los siguientes:

- **Congelador.** Disminuye la temperatura del alimento a su punto eutéctico.
- **Cámara de vacío.** Proporciona un entorno limpio y a veces estéril para el proceso; proporciona las temperaturas y presiones necesarias para secar el producto por sublimación.
- **Condensador.** Su principal función es eliminar los vapores condensables antes de que entren en los sistemas de vacío. El condensador puede estar dentro o fuera de la cámara de liofilización.

- **Sistema de Vacío.** Proporciona las presiones necesarias para las fases de secado primario y secundario.⁴⁷

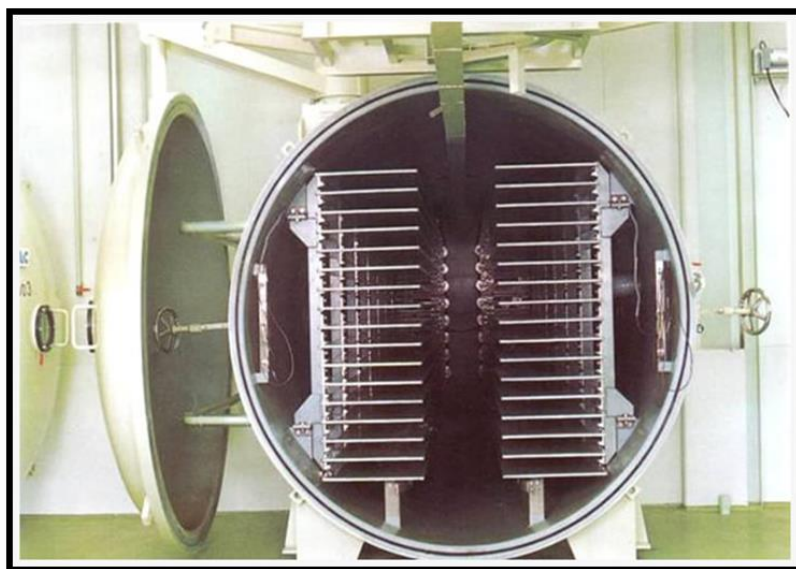


Ilustración 19. Liofilizador Industrial de Bandeja.⁴⁷

4.3. CACAO LIOFILIZADO

Investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha revelan que el grano de cacao, así como sus derivados (polvo de cacao, chocolate, bebidas en base cacao, etc) son productos ricos en un tipo de compuestos antioxidantes (polifenoles). La bibliografía que existe sobre este tipo de compuestos antioxidantes y su actividad biológica es extensa, ya que son sustancias muy conocidas por su amplia distribución en frutas y vegetales.

Otro parámetro importante son los lípidos ya que la semilla de cacao está constituida hasta un 45 % de lípidos en base seca, estos en forma natural como todos los granos crudos presentan una fuerte actividad lipásica, cuya función biológica es aprovechar los lípidos para suministrar nutrimentos y fortalecer la germinación, esta actividad aumenta cuando la actividad de agua es elevada pero a diferencia de otras reacciones enzimáticas puede llevarse a cabo con una baja actividad de agua, esto se debe a que los triacilglicéridos líquidos tienen una gran movilidad y favorecen su contacto con la lipasa. Sin embargo, las grasas insaturadas son más susceptibles a este tipo de reacciones.⁴⁸

Tanto los antioxidantes como los lípidos del cacao son fácilmente degradables por las condiciones ambientales externas como lo son temperatura, luz, oxígeno, microorganismos contaminantes y enzimas. El contenido antioxidante de las almendras de ca-

cao, así como sus propiedades sensoriales y nutritivas puede verse comprometidas al someter al grano a temperaturas elevadas para su secado, por ello la deshidratación del grano es uno de los pasos post cosecha con mayor importancia. El proceso de liofilización es una alternativa para aumentar su vida útil durante el almacenamiento conservando sus propiedades sensoriales y nutritivas ya que emplea bajas temperaturas y disminuye actividad de agua.

Pese a que la lipólisis de las grasas puede ocurrir en alimentos con baja actividad de agua son más susceptibles las grasas insaturadas, teniendo en el cacao un mayor porcentaje de grasas saturadas y un buen contenido antioxidante que en conjunto con la liofilización brindan estabilidad al producto.⁴⁹

Actualmente en Morelia, Michoacán, México, se ubica una empresa dedicada a la liofilización de alimentos de forma industrial, la empresa de nombre SioSi Alimentos con la que en conjunto se realizó este proyecto de tesis y la cual proveyó la materia prima (cacao liofilizado) para llevar acabo la experimentación.

II. JUSTIFICACIÓN

Numerosos estudios epidemiológicos recientes ponen de manifiesto la asociación entre el consumo de alimentos ricos en polifenoles, fibra y omegas (6-9) en la dieta y la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, como las enfermedades cardiovasculares, los procesos carcinogénicos y, las enfermedades neurodegenerativas. El cacao es un fruto con una variada composición nutricional, aporta antioxidantes, fibra y lípidos mono y polinsaturados. Diversos estudios demuestran que el consumo de cacao y chocolate incrementan la actividad antioxidante, un atributo deseable como defensa contra las especies reactivas de oxígeno (ERO), modula la función plaquetaria e inflamación, disminuye la presión arterial e intervienen en la disminución de colesterol LDL y TG en sangre. Aunque no existe consenso sobre la cantidad óptima a consumir, puede sugerirse que el consumo diario de chocolate rico en cacao es una buena elección para reducir, al menos parcialmente, el riesgo cardiovascular.

En este estudio para evaluar el efecto hipolipidémico que pudiera presentar el cacao liofilizado (CL) se propuso emplear como modelo biológico ratas Wistar machos adultos. Pese a que el hámster presenta una similitud del metabolismo de las grasas con el humano mejor que el de la rata, en estudios previos al ensayo biológico observamos que este era susceptible a la concentración elevada de compuestos bioactivos presentes en el cacao, traducido en deterioro de la salud del hámster, lo que podría presentar alteraciones en los resultados finales de la prueba, debido a esto se asumió que el modelo ideal para las pruebas sería la rata.

III. HIPÓTESIS

Los elementos constituyentes de la semilla de cacao, tales como antioxidantes, ácidos grasos insaturados y fibra en conjunto, podrían mostrar un efecto hipocolesterolemico e hipolipidémico en un modelo biológico de experimentación *in vivo* empleando ratas Wistar como modelo biológico.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la composición química de cuatro productos basados en cacao y determinar en cual se presenta un mayor efecto sobre la disminución de las concentraciones de lípidos séricos en modelos biológicos con dislipidemias.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análisis de la composición química y nutricional de cuatro productos basados en cacao, incluyendo cacao liofilizado producido por la empresa SioSi Alimentos mediante análisis bromatológico.
- Determinar el contenido de polifenoles y flavonoides totales en cada muestra de cacao y dilucidar si la concentración de éstos se ve afectada por el previo procesamiento al que fueron sometidos los granos de cacao
- Elaborar dietas a base de cacao con el fin de evaluar el efecto del consumo del alimento en los niveles séricos de colesterol y triglicéridos utilizando ratas Wistar macho como modelo biológico.
- Analizar la acumulación y/o disminución de grasa en hígado y heces de acuerdo al consumo de cada dieta experimental.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAS PRIMAS

- **Cacao sin fermentar liofilizado. CLS.** Se empleó cacao liofilizado del estado de Chiapas variedad Criollo, elaborado por la empresa SioSi Alimentos ubicada en Morelia Michoacán. Se usó el lote de Producción PTFAC011537.
- **Cacao fermentado y secado al sol. CFS.** Se empleó cacao fermentado y secado al sol del estado de Chiapas proporcionado por la empresa SioSi Alimentos SAPI de CV.
- **Cacao en polvo comercial. CPC.** Se empleó cacao en polvo comercial proporcionado por la empresa SioSi Alimentos SAPI de CV.
- **Chocolate comercial. CHC.** Chocolate comercial de la Marca Lindt®, el cual contiene 90% cacao, y adquirido en un supermercado en Morelia, Michoacán.

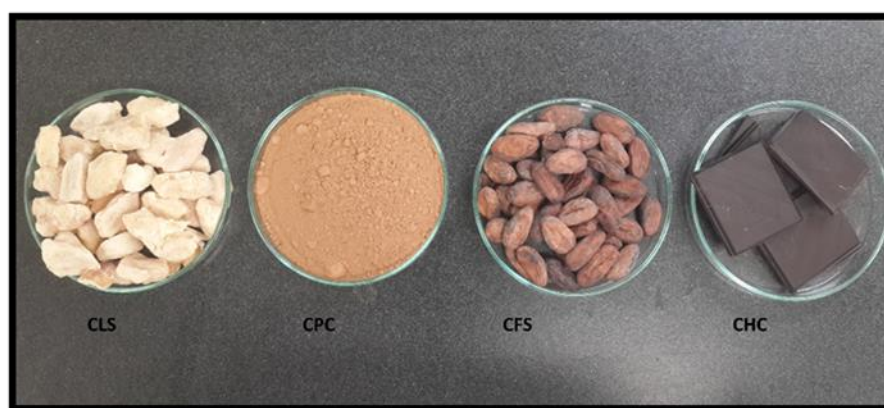


Ilustración 20. Productos de cacao empleados en el estudio.
CLS (cacao sin fermentar liofilizado), CPC (cacao en polvo comercial), CFS (cacao fermentado secado al sol), CHC (chocolate comercial con 90 % de cacao).

2. INGREDIENTES PARA ELABORACIÓN DE DIETAS

La lista de ingredientes para elaboración de la dieta fue de acuerdo a lo referenciado por el Instituto Americano de Nutrición para Animales de experimentación en mantenimiento.⁵⁰ Ver tabla 5.

Tabla 5. Materias Primas empleada en la elaboración de las dietas.

INGREDIENTE	NUTRIENTE APORTADO
Caseína, Harlan®	Proteína
Almidón	Carbohidratos
Sacarosa	Carbohidratos
Celulosa	Fibra
Aceite de Soya (Nutrioli®)	Lípidos
Mezcla de Vitaminas AIN-93M, Harlan®	Vitaminas
Mezcla de Minerales AIN-93M, Harlan®	Minerales
Colesterol al 95%, Sigma-Aldrich®	Hipercolesterolemia
Aceite de Coco puro, Louana®.	Hipertrigliceridemia

3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

3.1. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

- **Humedad.** Determinación de acuerdo al Método oficial de la AOAC (2000) número 934.01.⁵¹
- **Cenizas.** Método para determinación por incineración. Normas Sanitarias de Alimentos. Tomo 1. Norma técnica general de métodos físicos y químicos para análisis de alimentos.
- **Proteína.** Determinación por el Método Micro Kjeldahl AACC (2000). Se realizó en tres partes: digestión, destilación y titulación.
- **Lípidos.** Método de Soxhlet. Normas técnicas y generales de métodos físicos y químicos para análisis de alimentos. Normas Sanitarias de Alimentos. Tomo 1. OMS. 1967
- **Fibra Dietética.** Soluble e Insoluble. Método enzimático de Prosky et al., (1998). Se realizó en dos partes: digestión y filtración.⁵²



Ilustración 21. Material empleado para la determinación de humedad



Ilustración 22. Material empleado para la determinación de cenizas



Ilustración 23. Material empleado para la determinación de proteína

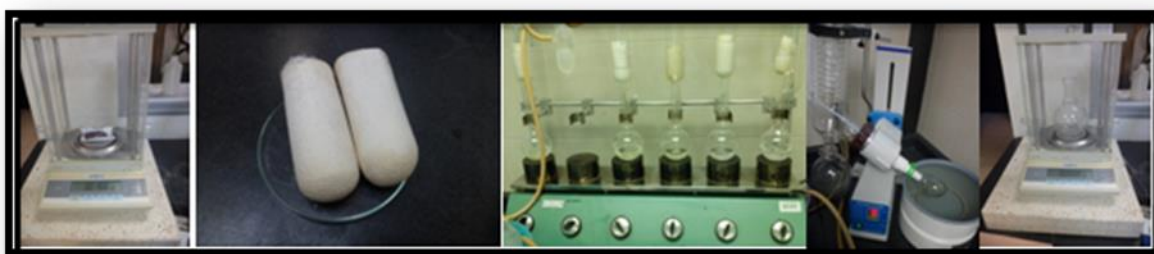


Ilustración 24. Material empleado para la determinación de lípidos



Ilustración 25. Material empleado para la determinación de fibra dietaria

3.1.1. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Las muestras de los diferentes productos de cacao: cacao sin fermentar liofilizado (CL), cacao fermentado secado al sol (CFS), polvo de cacao comercial (CPC) y chocolate comercial con 90% de cacao (CHC), se enviaron al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. para análisis del perfil de ácidos grasos donde se cuantificaron 5 ácidos grasos que son de importancia alimenticia y de salud, y que fueron esteárico, palmítico, oleico, linoleico y linolénico. La cuantificación se realizó por el método de la NMX-F-490-1999-NORMEX. Alimentos-Aceites-Grasas. Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases.⁵³

3.2. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

3.2.1. COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

La determinación de compuestos fenólicos totales se llevó a cabo mediante el método Singleton y Rossi (1965).

Extracción. Se pesó 1 g de muestra y se le adicionaron 10 mL de metanol. La mezcla se mantuvo en constante agitación por 24 h, y protegiéndose de la luz; pasado este tiempo se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min y los extractos obtenidos se guardaron a 4°C hasta su posterior utilización. Este extracto se utilizó para determinar polifenoles totales y flavonoides (catequinas).⁵⁴

El contenido de polifenoles totales presentes en las muestras de los diferentes tipos de cacao se determinaron de acuerdo con el método colorimétrico Folin–Ciocalteu. Para la realización de ésta técnica se utilizó como estándar al ácido gálico. Se tomó una alícuota de 40 µL de extracto y se diluyó con 460 µL de agua. Se le adicionaron 250 µL del reactivo de Folin– Ciocalteu (1:10 v/v), y se mezcló manualmente por 5 min y se le adicionaron 1,250 µL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 20%. Se incubó por 2 h a temperatura ambiente protegiéndose de la luz y se leyó a 765 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como mg equivalente de ácido gálico/gramo de muestra (mgEAG/g).⁵⁴



Ilustración 26. Material empleado para la determinación de compuestos antioxidantes

3.2.2. FLAVONOIDES (CATEQUINAS)

La determinación de flavonoides se efectuó mediante el método establecido por (Zhis-hen, Mengcheng y Jianming, 1999)

Para la realización de esta técnica se utilizó como estándar la $\pm$ catequina. Se tomó una alícuota de 40 μ L de extracto y se diluyó con 460 μ L de agua. Se le adicionaron 750 μ L de NaNO_2 al 5%. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 6 min y se le adicionaron 150 μ L de AlCl_3 al 10%. Se dejó transcurrir 5 min y se adicionaron 500 μ L de NaOH 1M y 1,250 μ L de agua destilada y se leyó a 510 nm antes de 30 min en un espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como mg equivalente de catequina/gramo de muestra (mg de Equivalentes de catequina/g).⁵⁴

4. ENSAYO BIOLÓGICO

4.1. SELECCIÓN DEL MODELO BIOLÓGICO

Debido a la gran similitud y homología entre el genoma de roedores y humanos, estos modelos animales son una herramienta fundamental para el estudio de condiciones que afectan a los humanos. Muchos investigadores consideran la rata como un modelo animal casi perfecto debido a su corto tiempo generacional, alta performance reproductiva, y fácil mantenimiento.

La obesidad en animales puede ser inducida mediante manipulación genética, dietética o inducción de alteraciones neuroendocrinas. El método que nosotros empleamos es uno de los más ampliamente utilizados para inducir obesidad en ratas, y que fue mediante una alimentación con dietas hipercalóricas.

4.2. MANEJO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En el ensayo biológico se utilizaron 24 ratas Wistar machos adultos jóvenes de 60 días de edad, y separados en 6 lotes de 4 ratas (4 formulaciones y 2 testigos). Las ratas Wistar utilizadas en el modelo biológico fueron adquiridas en el bioterio de la UNAM Campus Juriquilla, Querétaro.

Se trabajó en el bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH. Las ratas Wistar se mantuvieron en un periodo de adaptación de 7 días con alimento comercial, y posteriormente se colocaron en jaulas metabólicas individuales y en un ambiente aislado de ruidos y controlado: temperatura entre 18 y 26 °C, humedad relativa del 40-70%, y con ciclos de 12 h luz por 12 h de oscuridad.

Los animales fueron pesados al inicio y al término del periodo de experimentación. Se buscó que hubiera un peso igual para cada lote de experimentación. El peso promedio de los animales fue de 450 g al inicio de la experimentación. Se dividieron en seis lotes de cuatro animales cada uno y se alimentaron durante 21 días con cada una de las dietas experimentales, y suministrando agua *ad libitum*. El consumo total de alimento se determinó por lote después de los 21 días.

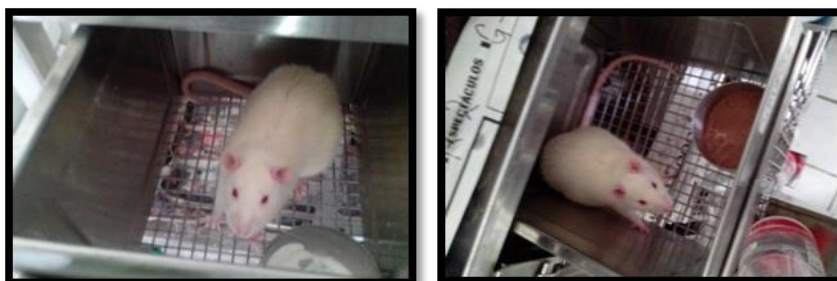


Ilustración 27. Ratas Wistar en sus jaulas individuales.



Ilustración 28. Bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología, UMSNH.

4.3. FORMULACIÓN DE LAS DIETAS

La formulación base de las seis dietas experimentales fue de acuerdo a lo establecido por la AIN-93 para animales adultos en mantenimiento.⁵⁰ Se trabajó con una dieta de referencia, una dieta control, y 4 dietas experimentales. La dieta de referencia se basó en la AIN-93. A la dieta control se le adicionó aceite de coco para inducir un cuadro de hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia, respectivamente. Las dietas experimentales se basaron en la dieta control y el uso de los diferentes alimentos en investigación. Dichas formulaciones estuvieron basadas en sustituir el aceite de soya por manteca de cacao y de esta manera poder observar el efecto benéfico del consumo de cacao en función de sus lípidos sin dejar fuera el efecto de los antioxidantes y fibra. Se manejó un aumento del 50% de lípidos de cacao con respecto al lípidos control, soya; y con la finalidad de que hubiera una respuesta más rápida a los cambios fisiológicos en los animales de prueba con las dietas experimentales. Los demás nutrientes se ajustaron para ser lo más posible equivalentes a la dieta de referencia.

A continuación, se describen las formulaciones empleadas para las dietas, y en la tabla siguiente se describe la composición de éstas.

- DIRE: Dieta de Referencia establecida por la AIN-93. Control negativo: animales sanos.
- DICO: Dieta Control Positivo (animales hipercolesterolémicos e hipertrigliceridémicos). Adicionada con 1.5% de colesterol y 10% de aceite de coco para inducir hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, respectivamente.
- DCLS: Dieta Cacao Sin Fermentar Liofilizado. Dieta modificada. Se sustituye el aceite de referencia, es decir, el aceite de soya, con el equivalente del aceite proveniente del cacao sin fermentar liofilizado.
- DCPC: Dieta Cacao en Polvo Comercial. Dieta modificada. Se sustituye el aceite de referencia con el aceite proveniente de cacao en polvo comercial. Se decidió bajar dicha concentración porque los animales rechazaron este alimento y no comían, además de presentar un cuadro de estrés excesivo.
- DCFS: Dieta Cacao Fermentado Secado al Sol. Dieta modificada. Se sustituye el aceite de referencia con el aceite proveniente del cacao fermentado secado al sol.
- DCHC: Dieta Chocolate Comercial (90% de cacao). Dieta modificada. Se sustituye el aceite de referencia con el aceite proveniente del chocolate comercial (90% de cacao, Lindt®).

Tabla 6. Composición Dietas

Ingredientes	DIRE	DICO	DCLS	DCPC	DCFS	DCHC
Almidón	665	550	470	305	509	513
Sacarosa	100	100	100	200	100	100
Caseína	100	100	77	12	82	88
Celulosa	50	50	16	-	21	37
Aceite de Soya	40	40	-	-	-	-
Minerales	35	35	28	14	30	30
Vitaminas	10	10	10	10	10	10
Colesterol	-	15	15	15	15	15
Aceite de Coco	-	100	100	100	100	100
CHC	-	-	-	-	-	107
CFS	-	-	-	-	132.5	-
CPC	-	-	-	344	-	-
CLS	-	-	184	-	-	-

- CHC= Chocolate comercial (90% de cacao), CFS= Cacao fermentado secado al sol, CPC= Cacao en polvo comercial, CLS= Cacao sin fermentar liofilizado. DIRE (dieta de referencia), DICO (Dieta control), DCLS (dieta cacao sin fermentar liofilizado), DCPC (dieta cacao en polvo comercial), DCFS (dieta cacao fermentado secado al sol), DCHC (dieta chocolate comercial 90 % de cacao).

Debido a que uno de los parámetros de mayor relevancia en el experimento eran los lípidos del cacao, las dietas fueron diseñadas en función de estos. Para las dietas control, referencia, y CPC, el porcentaje de lípidos fue de 4%, para las dietas DCLS, CFS, y DCHC el porcentaje de lípidos fue de 6%. Las dietas DCLS, CFS, DCHC, presentaron un 50% más de lípidos en su formulación con respecto a la dieta de control; y esto debido a que se decidió usar una mayor concentración de lípidos que la dieta control.

El cálculo para determinar la cantidad necesaria de cada producto de cacao para las dietas DCLS, DCPC, DCFS y DCHC, se efectuó de la siguiente forma, tomando en cuenta la cantidad de lípidos obtenidos en análisis bromatológico para cada producto de cacao:

100 g de Cacao Liofilizado $\Rightarrow$ 32.6% de lípidos

¿Cuántos gramos necesitamos de CLS para una dieta de 6% de lípidos?

En el caso de cacao liofilizado:

$$\text{Lípidos} = \frac{6 * 100}{32.6} = 18.4 \text{ g de CLS}$$

Ahora para 1000 g de dieta: 184 g

Otros componentes de la dieta, tales como la fibra, minerales, carbohidratos y proteína, fueron determinados también respecto a la dieta control y el resultado de los análisis bromatológicos para cada producto de cacao. De acuerdo a los gramos del producto de cacao utilizado y la concentración de dicho componente (fibra, minerales, carbohidratos o proteína) presente.

Ejemplo. La cantidad de fibra (celulosa) en la Dieta Control es de 50 g en 1000 g de dieta, tomando al cacao liofilizado en el que por cada 100 g de CLS hay 18.5 g de fibra, por lo tanto, en 184 g que fue la cantidad de cacao a emplearse en la dieta DCLS tenemos una cantidad de fibra de 34.04 g; por lo que restarían adicionar solo 16 g de celulosa para llegar a los 50 g de fibra para esta dieta. De la misma forma se realizaron los cálculos para determinar la cantidad exacta de proteína, minerales y carbohidratos a incorporar a las diferentes dietas de cacao.

Observaciones:

- Se agregó sacarosa en todas las dietas para hacer más agradable el producto terminado a los animales. En el caso de la dieta de DCPC, la cantidad de sacarosa es mayor que las otras dietas debido a que los animales no encontraban apetible la dieta y se modificó.
- Para inducir los cuadros de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia en las ratas se adicionó a la dieta 1.5% de colesterol y 10% de aceite de coco, respectivamente.
- No se agregó celulosa en la dieta con cacao en polvo comercial debido a que el contenido de esta se encontraba más concentrada.
- Para evitar deficiencias vitamínicas se administró 1% de mezcla de vitaminas a todas las dietas.

4.3.1. CONSUMO DE ALIMENTO

El consumo de alimento se determinó durante los 21 días del ensayo biológico. Los animales en estudio se pesaron al inicio, y posteriormente cada 7 días para evaluar la pérdida o ganancia de peso corporal.

4.4. SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

El sacrificio se llevó a cabo después de 21 días de experimentación. Se sacrificaron mediante dislocación cervical, el cual es un método de sacrificio humanitario y usado

habitualmente para la mayoría de los roedores, causando inconsciencia y muerte inmediata.⁵⁵

Anterior al sacrificio se recolectaron las heces de cada lote durante la última semana de experimentación y se almacenaron libres de humedad para su posterior análisis de lípidos. Se extrajeron la muestra de sangre por punción cardíaca y el hígado de los 4 ejemplares de cada lote para su posterior análisis.

4.5. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS

La determinación cuantitativa de los diferentes parámetros sanguíneos se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos CEDIMI, ubicado en Morelia, Michoacán.

Tabla 7. Métodos para determinaciones sanguíneas.

Parámetro Sanguíneo	Método
Triglicéridos	Enzimático colorimétrico. COBAS 600 ROCHE
Colesterol	Enzimático colorimétrico. COBAS 600 ROCHE
Lipoproteína HDL	Colorimetría
Lipoproteína LDL	Colorimetría
Glucosa	Hexoquinasa. COBAS 600 ROCHE
Urea	Ureasa y glutamato deshidrogenasa. COBAS 600 ROCHE
Creatinina	Reacción cinética Jaffe. COBAS 600 ROCHE

4.5.1. DETERMINACIÓN LÍPIDOS EN HECES E HÍGADO

Para determinar la cantidad de lípidos totales en heces y en hígado de los animales en estudio, las muestras previamente se deshidrataron en estufa para obtener una humedad menor al 10% y posteriormente se realizó la extracción de grasa por el método de Soxhlet, Los resultados se reportaron como lípidos en peso fresco, ya sea de heces o hígado.

4.5.2. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD EN HÍGADO Y EN HECES

Para determinar el porcentaje de humedad presente en heces y en hígado de los animales en estudio, las muestras una vez pesados en fresco se deshidrataron en estufa, se pesaron de nuevo y por diferencia de pesos se determinó la humedad.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de las determinaciones biológicas fueron analizados estadísticamente utilizando el programa JMP6. Se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) de 1 vía y la prueba Tukey-Kramer en el programa JMP. Se empleó el programa Microsoft Excel para realizar la representación gráfica de los resultados.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

A continuación, se presenta el análisis proximal, el perfil lipídico, su contenido de antioxidantes y el ensayo biológico de los diferentes productos de cacao que se utilizaron.

1.1. ANÁLISIS BROMATOLÓGICO

Los resultados obtenidos del análisis bromatológico del cacao concordaron con el reporte bibliográfico de otras variedades de cacao, sin embargo, como se mencionó anteriormente el porcentaje de lípidos y demás nutrientes del fruto varía de acuerdo a la clase de cacao que se produce por región y por época del año.

Tabla 8. Composición nutrimental de los diferentes productos de cacao.100 g

Componente (g)	Polvo De Cacao	Cacao Liofilizado Sin Fermentar	Cacao En Polvo Comercial	Cacao Fermentado Y Secado Al Sol	Chocolate Comercial (90% Cacao)
Agua	3.0	0.1	3.4	7.6	1.0
Proteína	19.6	12.3	25.6	13.5	11.6
Lípidos	13.7	32.6	11.6	45.3	56.0
Carbohidratos	20.9	32.8	21.6	8.0	15.0
Fibra dietética	37.0	18.5	31.7	22.0	12.0
Cenizas	5.8	3.7	6.1	3.6	4.4
TOTAL	100	100	100	100	100
Calorías	322.3	492.3	324.9	515.7	622.4

La fracción lipídica es uno de los parámetros de mayor importancia en el cacao. Éste presentó diferencias significativas en los diferentes productos, ya que están relacionadas con las diferencias en su procesamiento. El chocolate comercial tuvo la mayor concentración con un valor de 56.0%, seguida del cacao fermentado al sol con 45.3%. El cacao liofilizado SioSi presentó un valor de 32.6%, y el cacao en polvo presentó la menor cantidad de lípidos, 11.6%.

Otro de los parámetros en el que se observa diferencias significativas es en las proteínas, y como se puede ver el producto cacao en polvo comercial contiene un 25.6%, que es aproximadamente el doble con respecto a los otros productos de cacao. Esto se debe a que este producto fue previamente desgrasado, y por tanto disminuyen los lípidos y aumentan los otros nutrientes.

En el caso de la fibra dietética sucede lo mismo, debido a que el cacao en polvo comercial disminuye lípidos se da un aumento de fibra, éste presentó un 31.7%, seguido por el cacao fermentado secado al sol con un 22%, el cacao sin fermentar liofilizado con un 18.5% y finalmente el chocolate comercial (90% de cacao) con un 12%.

Se puede apreciar que el contenido de carbohidratos es menor en el cacao fermentado secado al sol, debido al proceso de fermentación al que fue sometido anteriormente, mientras que el mayor contenido de carbohidratos lo presenta el cacao sin fermentar liofilizado, y que corresponde al grano que fue extraído directamente del fruto del cacao, el cual conserva todos sus componentes, como el mucilago que rodea al grano el cual contiene una gran cantidad de azúcares.

Se observa que en general las muestras son una buena fuente de minerales, de igual manera concentrándose una mayor cantidad en el cacao en polvo comercial.

1.2. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

En la Tabla 9 se presenta el perfil de ácidos grasos de los diferentes tipos de cacao. El análisis solo se efectuó para los ácidos grasos esteárico, palmítico, oleico, linoleico y linolénico, y considerando a éstos como a los de mayor importancia en productos de origen vegetal.

Tabla 9. Ácidos grasos por 100 g de aceite.

Ácido Graso (%)	Cacao Liofilizado Sin Fermentar	Polvo De Cacao Comercial	Cacao Fermentado Secado Al Sol	Chocolate Comercial 90% Cacao
SATURADOS				
Esteárico	24.2	9.8	25.0	6.7
Palmítico	22.2	8.3	21.2	19.0
Suma	46.4	18.1	46.2	25.7
INSATURADOS				
Oleico	23.5	9.0	22.2	14.9

Linoleico	1.6	0.8	2.0	1.7
Linolénico	0.2	0.0	0.1	0.1
Suma	25.3	9.8	24.3	16.7
Otros	28.5	72.1	29.4	57.6
Total	100	100	100	100

La mayor concentración de ácidos grasos insaturados la presentó el cacao sin fermentar liofilizado, 25.3%, seguido del cacao fermentado al sol, 24.3%. Así mismo, estos mismos productos presentaron la mayor concentración de ácidos grasos saturados, 46% en ambos productos. El cacao comercial presentó la menor cantidad de ácidos grasos insaturados.

De acuerdo a lo reportado, el cacao sin fermentar liofilizado y el cacao fermentado secado al sol presentan mayor concentración de ácidos grasos benéficos para el organismo, tales como son la serie de los ácidos grasos omega: 9 (oleico), 6 (linoleico) y 3 (linolénico). Debido a las propiedades hipocolesterolémicas de los ácidos grasos poliinsaturados se espera que el consumo regular de cacao sin fermentar liofilizado al igual que cacao fermentado secado al sol tengan los mejores efectos benéficos en la regulación de lípidos en relación con el chocolate comercial o el polvo de cacao comercial.

1.3. COMPUESTOS ANTIOXIDANTES

Se estudió la concentración de polifenoles y flavonoides como agentes antioxidantes.

Tabla 10. Polifenoles Totales en los diferentes productos de cacao.

MUESTRA	Polifenoles Totales (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EqCatequina/g)
Cacao liofilizado sin fermentar	12.88 ± 0.61 ^a	11.67 ± 1.00 ^a
Cacao fermentado secado al sol	10.56 ± 0.22 ^b	5.19 ± 0.33 ^b
Cacao polvo comercial	9.86 ± 0.31 ^b	4.60 ± 0.28 ^b
Chocolate comercial (90% cacao)	3.06 ± 0.08 ^c	2.10 ± 0.21 ^b

- Media de 3 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.05).

En la Tabla 10 se presentan los valores de polifenoles totales encontrados en los diferentes productos de cacao, y en donde el cacao sin fermentar liofilizado SioSi presentó el mayor contenido de polifenoles totales; 12.88 mg/g de producto. Asimismo, se puede notar que el proceso de fermentación del cacao y la industrialización del polvo de cacao disminuyen el contenido de polifenoles totales con respecto al cacao sin fermentar liofilización SíoSí, ya que presentaron una disminución de 18.0% y 23.4% respectivamente. Así mismo, el chocolate comercial (90% cacao) tuvo un 76.2% de polifenoles totales menos que el cacao sin fermentar liofilizado. La industrialización de los productos de cacao afecta directamente la concentración de polifenoles.

En cuanto al contenido de flavonoides cuantificados como catequinas nuevamente el cacao liofilizado presentó el mayor valor, y se observó una clara disminución de los mismos en los otros productos. Existe una diferencia de un 55.5% en el cacao fermentado secado al sol con respecto al cacao sin fermentar liofilizado, atribuido entre otras cosas al proceso de fermentación y exposición a la luz solar, de igual manera, en el polvo de cacao comercial (90% cacao) se presentó un 60.6% y en el chocolate comercial en un 82.0% menos flavonoides (catequinas) que el en cacao sin fermentar liofilizado.

Esta disminución de componentes antioxidantes como son los polifenoles totales y flavonoides (catequinas) se debe a muchos factores, entre los que se encuentran el origen y procesamiento del cacao que generalmente está sometido a procesos térmicos que involucran la presencia de oxígeno, lo cual afecta negativamente la calidad de los productos de cacao, ya que generalmente se disminuye la concentración de moléculas bioactivas en el cacao, las cuales son benéficas en el organismo como son los antioxidantes, como se pudo observar en este estudio y en otros efectuados en 2015.⁵⁶

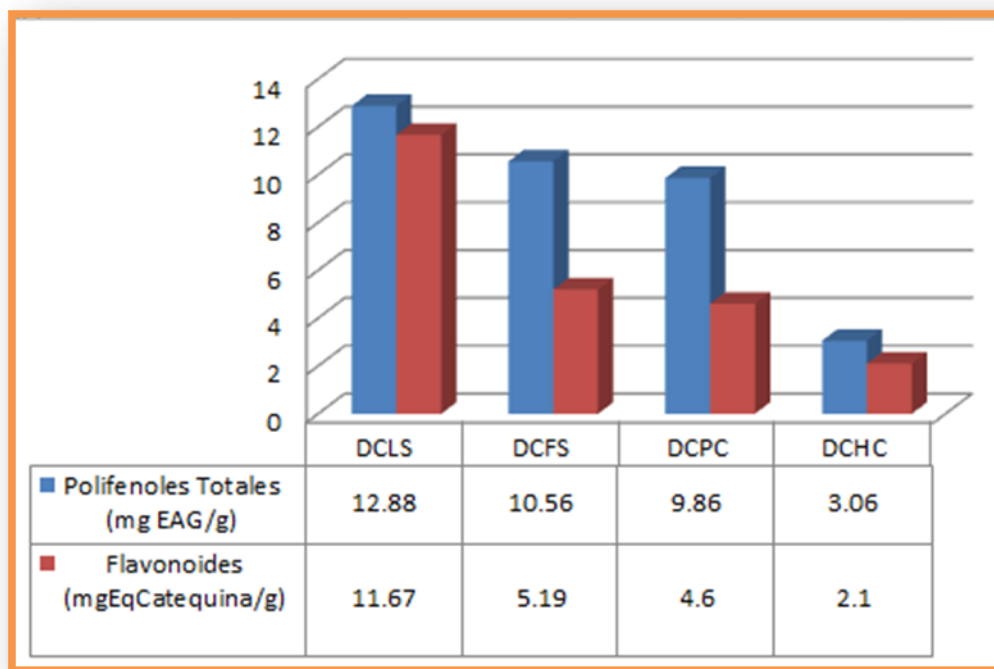


Ilustración 29. Antioxidantes en los diferentes productos de cacao

2. ENSAYO BIOLÓGICO

2.1. FORMULACIÓN DE LAS DIETAS

A continuación, la tabla 13 muestra la composición de las diferentes dietas y el porcentaje de cada ingrediente presente en la dieta. Cabe señalar que la dieta con cacao en polvo comercial presentó un porcentaje de lípidos en su formulación igual a la dieta control al final del estudio, y no mayor que las otras formulaciones. Lo anterior debido a que el cacao en polvo comercial es un componente con muy poco aceite, y que finalmente influyó desfavorablemente en el consumo de esta dieta por parte de los animales en estudio, ya que el sabor no era apetecible, y en donde el sabor se mejoró aumentando los gramos de sacarosa en la dieta. En esta dieta se decidió bajar a 4% los lípidos después de 1 semana de experimentación; es decir, este grupo estuvo 1 semana con una dieta de 6% de lípidos de cacao en polvo comercial y 2 semanas con un 4% de lípidos de cacao en polvo comercial.

Tabla 11. Composición Nutricional de las Dietas.

COMPONENTE	DIRE	DICO	DCLS	DCPC	DCFS	DCHC
Carbohidratos	66.5	55.0	53.0	37.4	52.0	52.9
Fibra	5.0	5.0	5.0	10.9	5.0	5.0
Proteína	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Lípidos	4.0	4.0	6.0	4.0	6.0	6.0
Minerales	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitaminas	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Sacarosa	10.0	10.0	10.0	20.0	10.0	10.0
Colesterol	0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Triglicéridos	0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Agua	0	0	0	1.7	1.0	0.1
TOTAL	100	100	100	100	100	100

- DIRE (dieta de referencia), DICO (Dieta control), DCLS (dieta cacao sin fermentar liofilizado), DCPC (dieta cacao en polvo comercial), DCFS (dieta cacao fermentado secado al sol), DCHC (dieta chocolate comercial 90 % de cacao).

2.2. CONSUMO DE ALIMENTO

Tabla 12. Consumo de alimento y peso corporal de los animales.

	DIRE	DICO	DCLS	DCPC	DCFS	DCHC
Consumo de Alimento (g)	513.4 ± 50.4 ^a	526.0 ± 59.6 ^a	504.0 ± 23.1 ^a	207.4 ± 5.3 ^b	484.8 ± 34.2 ^a	547.9 ± 11.1 ^a
Peso inicial (g)	457.0 ± 15.1 ^a	444.6 ± 30.0 ^a	456.6 ± 14.6 ^a	458.0 ± 14.8 ^a	444.0 ± 21.6 ^a	468.8 ± 30.4 ^a
Peso final (g)	518.1 ± 29.7 ^{a,b}	526.4 ± 26.5 ^a	492.8 ± 15.6 ^{a,b}	322.9 ± 15.6 ^c	455.8 ± 30.1 ^b	496.9 ± 32.9 ^{a,b}
Pérdida/Ganancia de peso (%)	13.3 ± 3.0 ^a	18.4 ± 2.2 ^a	7.9 ± 0.3 ^b	-29.4 ± 1.9 ^d	2.6 ± 1.8 ^c	6.0 ± 0.4 ^{b,c}

- Media de 3 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.05). DIRE (dieta de referencia), DICO (Dieta control), DCLS (dieta cacao sin fermentar liofilizado), DCPC (dieta cacao en polvo comercial), DCFS (dieta cacao fermentado secado al sol), DCHC (dieta chocolate comercial 90 % de cacao).

Durante el ensayo, la ingesta de alimento de los animales fue uniforme para todos los grupos, excepto para el grupo que consumió la dieta con cacao en polvo comercial. Este grupo presentó diferencia estadística significativa ($p < 0.05$), pero cabe señalar que fue debido a que este grupo de roedores rechazó el alimento desde un principio, y por tanto tuvo menor peso corporal al final del experimento. El consumo promedio fue de 464 g.

Por otro lado, si hubo diferencias significativas en el aumento o disminución de peso al final del ensayo entre los diferentes grupos experimentales y las dietas de control. Los animales con la dieta de referencia aumentaron 13.4%, mientras que los de control aumentaron 18.4%. Esto último se debió a que dichos animales consumieron un exceso de colesterol y triglicéridos, y, por tanto, una dieta más calórica; sin embargo, no hay una diferencia significativa. Asimismo, todas las dietas experimentales que contenían cacao presentaron ganancia de peso, pero menor a la observada en la dieta control. La ganancia de peso en todos fue menor al 8% y fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$) con respecto al control y entre ellas mismas. Se observó una pérdida excesiva de peso en la dieta del polvo comercial, 29.5%, pero recordando que este alimento no gustó a los animales desde un principio y se negaban a consumir alimento, y hasta hubo necesidad de reformular para que los animales no murieran por inanición. En forma global se podría inferir que el consumo de cacao tiende a regular el peso corporal.

Cabe mencionar que durante el ensayo biológico pudimos observar un comportamiento agresivo e hiperactivo por parte de los animales que consumían las dietas con cacao, esto puede deberse principalmente a los alcaloides presentes en el cacao, tales como la cafeína y principalmente teobromina, estos son un tipo de alcaloides de la familia de las metilxantinas. Se ha demostrado que las metilxantinas a dosis altas producen efectos ansiogénicos y alteraciones motoras.⁵⁷

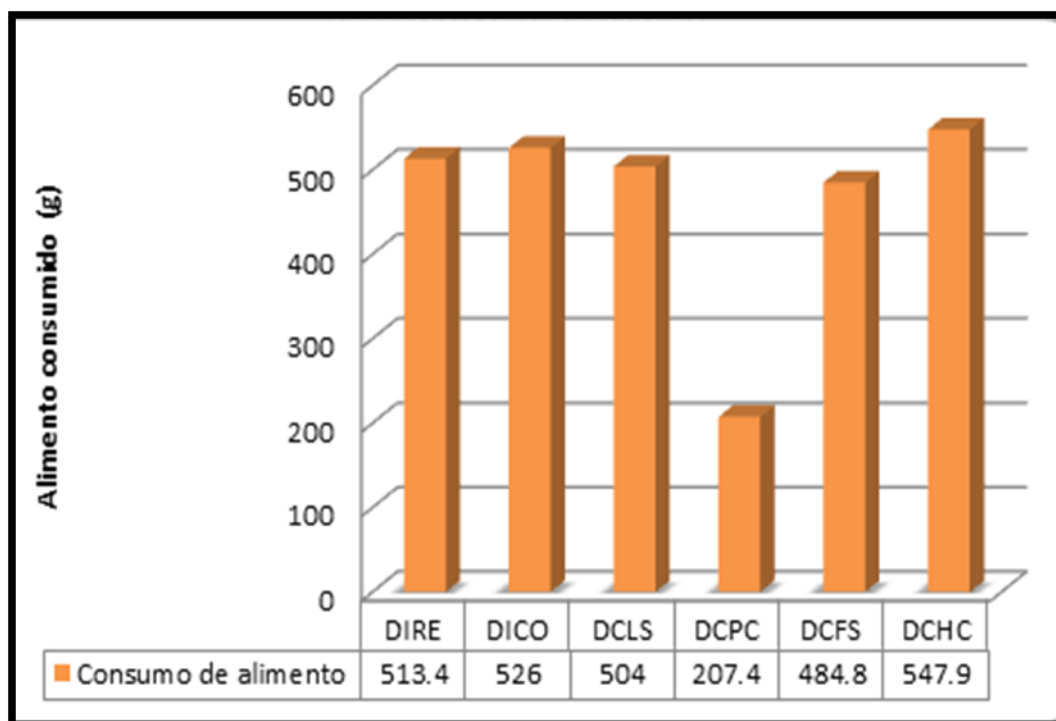


Ilustración 30. Gramos de alimento consumido por las ratas.

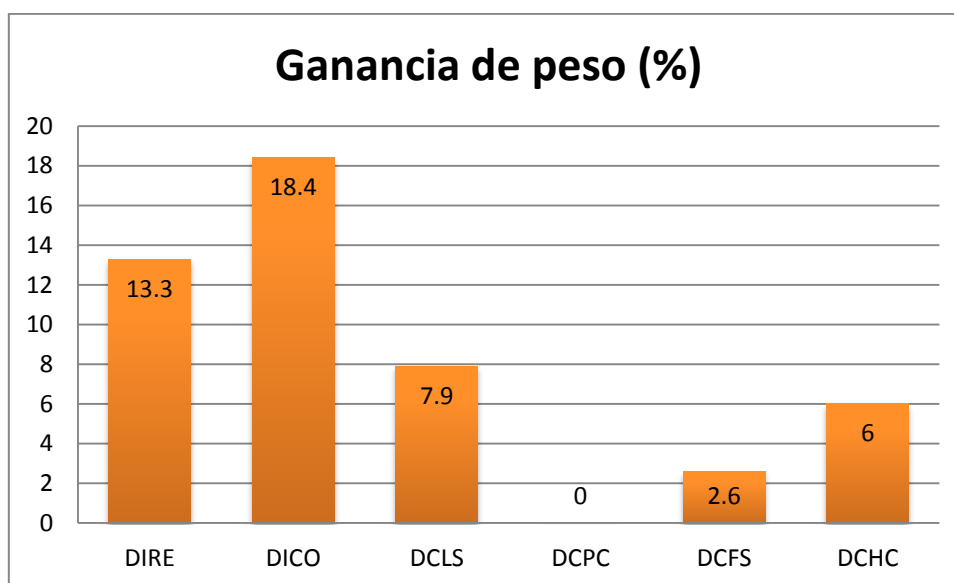


Ilustración 31. Porcentaje final de ganancia de peso corporal en los animales.

En la ilustración 30, se muestra la ganancia o pérdida de peso en porcentaje. Se observa una marcada diferencia sobre las dietas control y referencia respecto a las dietas

a base de cacao. La dieta más calórica fue la DCHC con 622.4 kcal; sin embargo, no hay una relación directa entre las calorías del alimento y la ganancia o pérdida de peso. Esto implica que la ganancia o pérdida de peso no depende del valor calórico del alimento, y que deberán existir otros aspectos nutritivos y/o de alimentos funcionales que explique este comportamiento.

2.3. PARÁMETROS SANGUÍNEOS

2.3.1. LÍPIDOS

En la Tabla 13 se puede observar que sí se pudo inducir el cuadro de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia en el modelo animal, esto se refleja en un mayor incremento de triglicéridos, colesterol y lipoproteína LDL en el grupo con dieta control con respecto al grupo con dieta de referencia. Cabe recordar que dichos cuadros se indujeron adicionando a la dieta control aceite de coco y colesterol a la formulación base: dieta de referencia.

Tabla 13. Comparación de Lípidos entre Dieta de Referencia y Dieta Control

Grupo	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol Total (mg/dL)	Lipoproteína HDL (mg/dL)	Lipoproteína LDL (mg/dL)
Dieta de Referencia	121.4 ± 20.0	52.0 ± 2.6	37.5 ± 6.1	5.0 ± 2.6
Dieta Control	218.5 ± 37.4	85.2 ± 9.7	36.4 ± 1.9	44.3 ± 16.4

- Media de 3 repeticiones ± desviación estándar.

Tabla 14. Comparación de Lípidos en las Diferentes Dietas de Cacao.

Grupo	Triglicéridos (mg/dL)	Lipoproteína HDL (mg/dL)	Lipoproteína LDL (mg/dL)	Colesterol total (mg/dL)
Dieta control	218.5 ± 37.4 ^a	36.4 ± 1.9 ^b	44.3 ± 16.4 ^a	85.2 ± 9.7 ^{b,c}
Cacao sin Fermentar liofilizado	127.3 ± 33.7 ^{a,b}	43.2 ± 0.7 ^b	27.3 ± 2.5 ^{a,b}	83.3 ± 6.7 ^c
Cacao polvo comercial	100.4 ± 44.4 ^b	114.0 ± 6.6 ^a	42.3 ± 2.3 ^a	167.2 ± 13.7 ^a
Cacao fermentado secado al sol	114.8 ± 9.3 ^b	45.9 ± 3.6 ^b	46.0 ± 3.6 ^a	93.6 ± 9.3 ^{b,c}

Chocolate comercial	169.7 ± 37.4 ^{ab}	48.3 ± 7.2 ^b	47.3 ± 11.0 ^a	110.3 ± 11.5 ^b
---------------------	----------------------------	-------------------------	--------------------------	---------------------------

- Media de 3 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.05).

En la Tabla 14 se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de lípidos realizado a los modelos biológicos que consumieron las dietas con los diferentes productos de cacao.

Se puede apreciar que existe una tendencia a disminución de triglicéridos en todos los grupos con dieta a base de cacao con respecto al grupo control. La menor concentración la presentó el cacao tipo polvo comercial, pero hay que señalar que fue una dieta que no gustó sensorialmente a los animales de dicho grupo y hubo un consumo menor de alimento, y por lo tanto este valor no se considera realmente representativo. Quitando este grupo de la discusión de resultados, podemos señalar que la dieta de cacao fermentado secado al sol presentó la mayor disminución en triglicéridos con un 47.4%; la dieta de cacao sin fermentar liofilizado disminuyó en 41.7%; y el chocolate comercial con 90% de cacao en un 22.3%.

Por otro lado, a nivel de colesterol total, podemos observar una disminución en la dieta DCLS, pero solo del 2.2%, y sin diferencia significativa. Esto implica que la dieta con el polvo liofilizado no afecta los niveles de colesterol. Por otro lado, hay un aumento del 9.9% y del 29.5% en las dietas del cacao fermentado al sol y chocolate comercial, respectivamente, para el colesterol total.

Se observó que hay un aumento en la concentración de colesterol bueno, HDL, en todas las dietas formuladas con el cacao. La mayor concentración la presentó la dieta del chocolate comercial, seguido del cacao fermentado al sol y por último el cacao sin fermentar liofilizado. Hubo un incremento de éste del 18.7% para el grupo que consumió cacao sin fermentar liofilizado; 26.1% en el grupo que consumió la dieta con cacao fermentado secado al sol; y 32.7% en el grupo con la dieta con chocolate comercial (90% cacao).

En cuanto a la concentración de la lipoproteína de baja densidad, LDL, o colesterol malo, se obtuvo respuesta favorable en el grupo que consumió la dieta con cacao sin fermentar liofilizado, ya que se presentó mayor disminución de este parámetro, alrededor del 38.3%. Efecto contrario se presentó en el grupo que consumió la dieta con cacao fermentado secado al sol, ya que hubo tendencia al incremento en un 3.8%, y efec-

to similar se presentó en la dieta con chocolate (90% de cacao) que incrementó un 6.8%.

El efecto en la tendencia a disminución de colesterol malo presentada en el grupo alimentado con la dieta con cacao liofilizado se puede atribuir a la conservación de todas sus propiedades nutritivas, tanto de lípidos, fibra y polifenoles. El cacao sin fermentar liofilizado fue el producto que presentó mayor cantidad de catequinas, que son un tipo de flavonoide relacionado con la tendencia a disminución de colesterol. Otro factor importante es la presencia de fitoesteres (sitosterol, estigmasterol, campesterol y olesterol), y que están presentes en un intervalo de 1.83 a 2.09 mg/g de cacao.

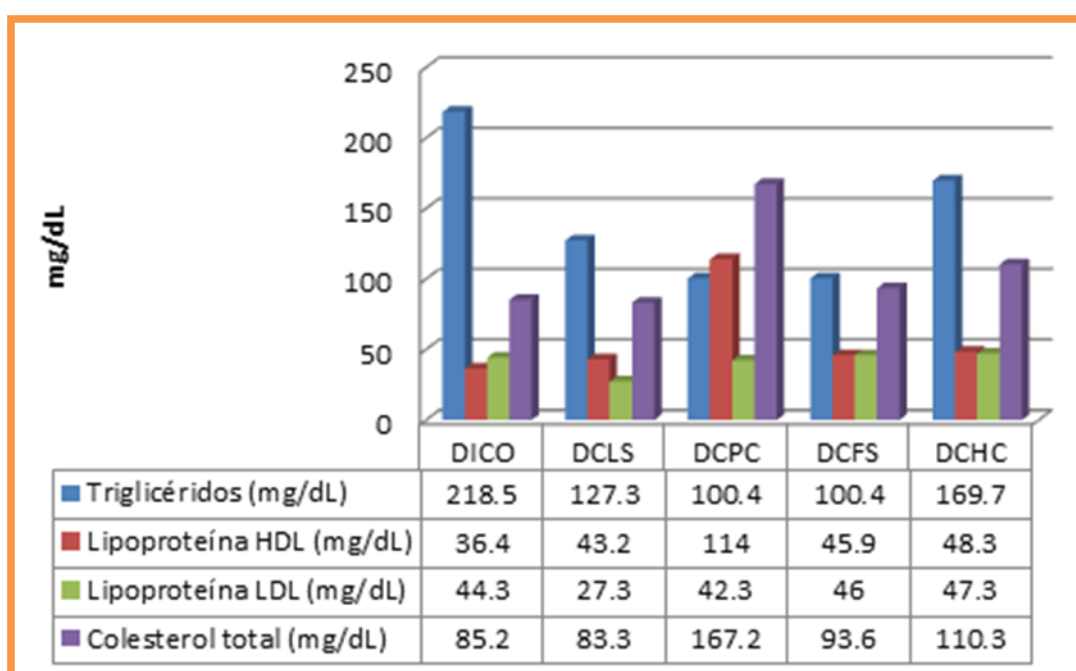


Ilustración 32. Análisis de Lípidos sanguíneos en Animales

2.3.2. OTROS PARÁMETROS SANGUÍNEOS

En la tabla siguiente se muestra el análisis de otros parámetros sanguíneos.

Tabla 15. Otros Parámetros Sanguíneos.

Grupo	Glucosa (mg/dL)	Urea (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Control	147.2 ± 31.3 ^a	34.2 ± 1.8 ^a	0.72 ± 0.02 ^a
Cacao sin fermentar liofilizado	140.2 ± 17.5 ^a	22.5 ± 1.6 ^{b,c}	0.70 ± 0.15 ^{a,b}
Cacao polvo comercial	105.1 ± 14.6 ^a	16.8 ± 1.8 ^d	0.63 ± 0.04 ^{b,c}
Cacao fermentado y secado al sol	124.5 ± 17.6 ^a	20.5 ± 1.4 ^{c,d}	0.56 ± 0.02 ^c
Chocolate comercial (90% cacao)	155.9 ± 5.2 ^a	25.9 ± 2.0 ^b	0.58 ± 0.04 ^c

- Media de 3 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma columna no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes (p<0.05).

También se realizó un estudio de otros componentes sanguíneos, que incluyeron los niveles de glucosa, urea y creatinina. La tabla anterior muestra dichos análisis. Se puede observar en la Tabla 15 que no hay diferencia estadística significativa en el parámetro de glucosa por el consumo de las diferentes dietas con algún tipo de cacao respecto al control. Sin embargo, las dietas de cacao tuvieron una tendencia a disminución de glucosa en los grupos que consumieron la dieta con cacao sin fermentar liofilizado en un 4.8%, y en el cacao fermentado secado al sol en un 15.4%. En cambio, en la dieta con chocolate comercial (90% de cacao) presentó un incremento en este parámetro en un 5.9%. Numerosos estudios han demostrado que los polifenoles pueden afectar favorablemente la ingesta y regulación de la glucosa teniendo un efecto hipoglucemiante.⁵⁸ Esta tendencia a la disminución de glucosa se puede relacionar con el mayor contenido polifenoles totales en el cacao sin fermentar liofilizado y en el cacao fermentado secado al sol; y sumando el efecto sinérgico de la fibra que compone a los diferentes tipos de cacao, y que pueden influir positivamente en el control de la glucosa.

Por otro lado, se puede ver una disminución estadísticamente significativa (p<0.05) de la urea en todos los grupos que consumieron alguna dieta a base de cacao, y efecto similar se presentó en la creatinina. Tanto la urea como la creatinina son productos de

desecho del metabolismo y el incremento de estos parámetros está relacionado con un mal funcionamiento de los riñones. El cacao es fuente de una sustancia conocida como “teobromina”, conteniendo aproximadamente 1.2% de esta, y dicha sustancia actúa como un diurético al agilizar la eliminación de desechos mediante la orina, lo que explicaría la disminución en parámetros de urea y creatinina y una mejora en el funcionamiento renal, aunque hacen falta más estudios para poder afirmar esta conclusión.

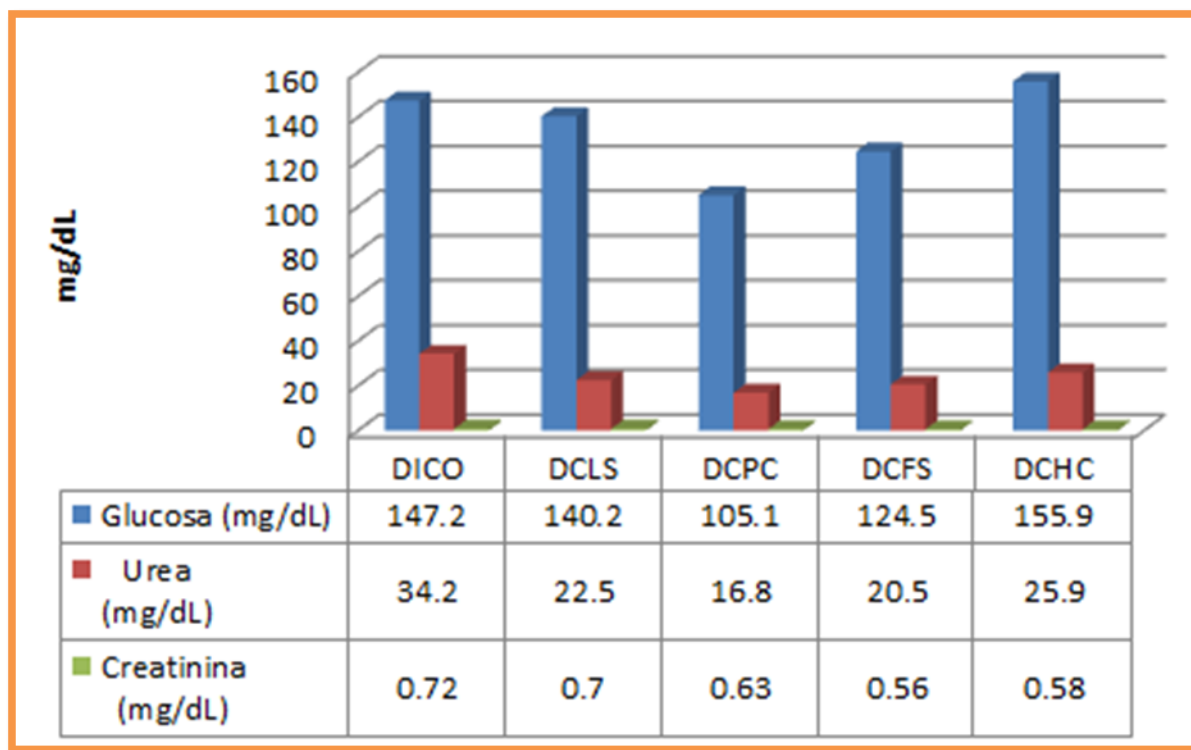


Ilustración 33. Otros Parámetros Sanguíneos en Animales

2.4. DETERMINACIONES EN HECES E HÍGADO

También se determinó la concentración de lípidos en heces e hígado en cada uno de los animales al final de la experimentación.

Tabla 16. % de Lípidos en Heces y en Hígado

	DICO	DCLS	DCPC	DCFS	DCHC
Lípidos en heces	15.7 ± 0.3 ^d	24.3 ± 0.5 ^b	43.2 ± 0.1 ^a	15 ± 0.1 ^d	20.9 ± 0.3 ^c
Lípidos en hígado	28.1 ± 0.6 ^b	29.2 ± 0.3 ^{a,b}	12.7 ± 0.2 ^c	27.4 ± 0.4 ^b	31.0 ± 0.6 ^a

- Media de 3 repeticiones ± desviación estándar. Letras iguales en la misma fila no muestran diferencia significativa, letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$). DICO (Dieta control), DCLS (dieta cacao sin fermentar liofilizado), DCPC (dieta cacao en polvo comercial), DCFS (dieta cacao fermentado secado al sol), DCHC (dieta chocolate comercial 90 % de cacao).

En la Tabla 16 se presentan los valores de lípidos en hígado de los grupos que consumieron los diferentes tipos de dietas, y en donde se observó que el grupo con la dieta de cacao fermentado secado al sol disminuyó el contenido de lípidos en un 2.49% con respecto al control, lo cual se relacionó con la disminución de triglicéridos que presentó este grupo de roedores. En cuanto al grupo que consumió la dieta con cacao sin fermentar liofilizado incrementó en un 3.9% el contenido de lípidos, y lo que estadísticamente no presenta diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control, además cabe mencionar que este grupo presentó una mayor reducción en las lipoproteínas LDL en sangre, lo cual puede sugerir que el aumento de lípidos en hígado sea a causa de las lipoproteínas HDL. En cambio, en la dieta con chocolate comercial incrementó significativamente ($p < 0.05$) el contenido de lípidos en un 10.3%.

En la ilustración 33 se puede observar el aspecto físico del hígado graso perteneciente a los diferentes grupos, donde se observa una mayor cantidad de células de grasa en los grupos que ingirieron la dieta control y la dieta de chocolate comercial (90% cacao), presentando un color más amarillo, con respecto a las dietas con cacao sin fermentar liofilizado y cacao fermentado secado al sol, y que tienen una tendencia al rojo brillante, característico de un hígado sano.

En cuanto a la cantidad de lípidos en heces se observó en todas las dietas problemas un aumento. Esto implica que los productos de cacao favorecen la excreción de lípidos vía heces. La mayor excreción se dio en la dieta con cacao sin fermentar liofilizado con un 54.8% con respecto al control, seguida de la dieta con chocolate comercial (90% de cacao) que fue de 33.1%, y finalmente la dieta con cacao fermentado fue de 15.0%.

La mayor excreción de lípidos se relacionó con una disminución de lípidos en el organismo, y este efecto pudo haberse debido a la fibra presente en los diferentes tipos de cacao; y en especial la fibra insoluble, la cual tiene la capacidad de formar geles al contacto con el agua y atrapar en su estructura lípidos y glucosa, y los cuales son finalmente excretados en heces. Y teniendo en cuenta que el cacao sin fermentar liofilizado aportó un 3.4% de fibra dietética a la formulación de la dieta, el cacao fermentado secado al sol aportó un 2.9% y el chocolate comercial aportó un 1.3%. El mayor aporte de fibra por parte del cacao sin fermentar liofilizado en la dieta tuvo un efecto positivo en la excreción de lípidos en heces, efecto que no se observó en la dieta con cacao fermentado secado al sol.

Además, la excreción de una mayor cantidad de lípidos en heces de los grupos en estudio está relacionada con la disminución de peso corporal estadísticamente significativa ($p < 0.05$) que presentaron los animales en estudio con respecto al control.

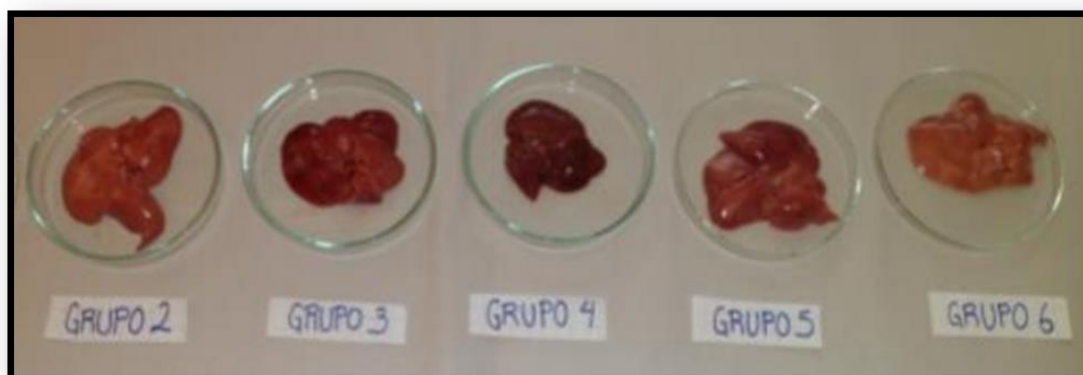


Ilustración 34. Apariencia física de los Hígados.

Grupo 2= Dieta Control, Grupo 3= Dieta con cacao sin fermentar liofilizado, Grupo 4= Dieta con cacao en polvo comercial, Grupo 5= Dieta con cacao fermentado secado al sol y Grupo 6= Dieta con chocolate comercial (90% cacao).

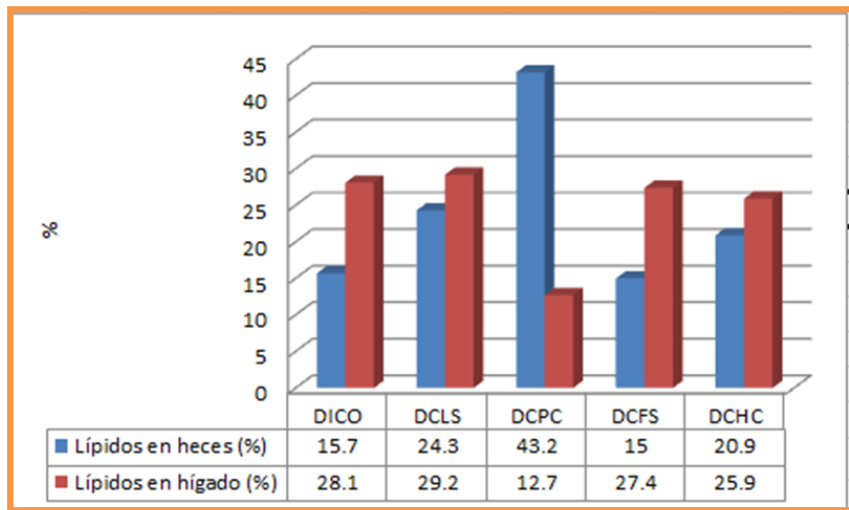


Ilustración 35. Lípidos en heces e hígado.

VII. CONCLUSIONES

Se realizó el estudio de cuatro productos de cacao. El estudio contempló un análisis proximal, cantidad de agentes antioxidantes, y pruebas con animales para observar su perfil de lípidos a nivel sanguíneo, además de otros parámetros sanguíneos, y concentración de lípidos en heces e hígado. Los productos en estudio fueron cacao sin fermentar liofilizado, cacao en polvo comercial, cacao fermentado secado al sol, chocolate comercial con 90% cacao. Los productos fueron proporcionados por la empresa SíoSí Alimentos, ubicada en Morelia, Michoacán.

La composición proximal de cada producto de cacao fue diferente, y se observó que fue afectada por la previa manufactura del grano de cacao al que fue sometido, y alterando en gran medida su composición nutricional.

En cuanto a parámetros nutricionales estos pueden ser benéficos como es el incremento de fibra o lípidos. Se observó que la mayor concentración de lípidos la obtuvo el chocolate de marca comercial con 90% de cacao con 56.0%, seguido del cacao fermentado al sol, 45.3%, y el cacao sin fermentar liofilizado SíoSí presentó un contenido de lípidos de 32.6%. Sin embargo, desde un punto de vista de perfil de ácidos grasos, el cacao sin fermentar liofilizado SíoSí presentó la mayor concentración de ácidos grasos insaturados, e incluyendo en los mismos los ácidos grasos omega 3, 6 y 9. Así mismo, el cacao sin fermentar liofilizado SíoSí presentó la mayor concentración de carbohidratos debido a la conservación del mucilago que rodea los granos. Por otro lado, el cacao fermentado secado al sol y el polvo de cacao comercial presentaron la mayor cantidad de fibra.

Ahora bien, el contenido de polifenoles totales, fue mayor en cacao sin fermentar liofilizado SíoSí con respecto a las otras muestras de cacao. Los compuestos bioactivos, tales como los antioxidantes de tipo fenólico, son susceptibles a daño durante el procesamiento industrial de los alimentos. El proceso de liofilización utilizado en este estudio mantiene el valor nutritivo completo del cacao liofilizado en esta investigación. Así mismo, el contenido de catequinas fue mayor también en el producto liofilizado.

Se realizaron pruebas *in vivo* usando ratas Wistar como modelo biológico. Se observó una disminución significativa en los niveles de triglicéridos en todas las muestras, siendo la dieta de cacao fermentado el que mayor disminución presentó, 47.4%. La dieta con cacao sin fermentar liofilizado disminuyó en un 41.7%. Cabe mencionar que el ca-

cao fermentado secado al sol fue uno de los productos que presentaron la mayor cantidad de fibra lo cual aumenta el efecto hipolipidémico.

Los resultados del producto cacao en polvo comercial no se consideran válidos porque los animales no consumieron la dieta de forma continua, y hubo necesidad de reformular. Los animales presentaron signos visibles de estrés y falta de apetito.

No hubo cambios significativos, $p < 0.05$, en la concentración de lipoproteínas tipo LDL y HDL entre las diferentes dietas. Sin embargo, la mayor concentración de colesterol HDL se presentó en el grupo alimentado con el chocolate comercial, pero este grupo también presentó la mayor cantidad de lipoproteínas tipo LDL. El grupo alimentado con cacao sin fermentar liofilizado SíoSí fue el que presentó la mayor disminución de LDL (Colesterol malo) con un valor de 38.3%, Tampoco hubo diferencia significativa, $P < 0.05$, en el colesterol total; pero siendo la dieta de cacao sin fermentar liofilizado SíoSí la que menor concentración presentó. Este presentó una disminución del 2.2%, y en cambio la dieta con cacao fermentado secado al sol incrementó un 9.8% y la dieta con chocolate comercial con 90% de cacao incrementó un 29.4% este parámetro.

No hubo cambios significativos en los niveles de glucosa, pero sí en los de urea y creatinina. El estudio sugiere un beneficio a nivel renal con los productos derivados del cacao.

El contenido de lípidos en heces aumentó significativamente en la dieta a base de cacao sin fermentar liofilizado SíoSí. Estos resultados sugieren que cacao sin fermentar liofilizado SíoSí favorece la excreción de lípidos.

En conclusión, globalmente, podemos decir que el cacao es un alimento con grandes propiedades nutraceuticas, lo cual se ve reflejado en su efecto sobre la disminución de lípidos séricos, lo cual puede beneficiar a individuos diana con afecciones metabólicas principalmente tipo ECV. Por otro lado, las propiedades químicas y nutricionales de los granos de cacao se ven alterada por el procesamiento al que se someten, y podemos decir que la liofilización es una excelente alternativa que puede utilizarse como método de conservación del cacao para aumentar su vida de anaquel, y, sobre todo, que conservar sus propiedades organolépticas y nutricionales, y que podría actuar como alimento funcional.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Chávez Rivera R; Ordoñez Gómez.2013. Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. Revista ECIPerú.No.1 Volumen 10,1-9.
2. Gómez Juaristi M, González Torres, Bravo L, Vaquero M, Bastida S y Sánchez Muñiz F.2011. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. Nutrición hospitalaria. No.2 Vol.26, 289-292.
3. Cala, R. (2001). Las Voces pre hispanas cacao, cacahuete y maíz en diccionarios generales de lengua castellana, catalana e italiana del siglo XX. Boletín Americanista, 51, 25-41.
4. Afoakwa, E. 2010. Chocolate production and consumption patterns. Chocolate Science and Technology. Oxford: Wiley-Blackwell. Edition first. pp. 1-11.
5. <https://sites.google.com/site/otrocacao/historia> (internet-01).
6. Avendaño Arrazate C, Villarreal Fuentes J, Campos Rojas E, Gallardo Méndez R, Mendoza López A, Aguirre Medina J, Sandoval Esquivel A, Espinosa Zaragoza S. 2011. Características botánicas y agronómicas del cacao. Diagnóstico del cacao en México. DR © Universidad Autónoma Chapingo.
7. www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/68sterc03m.pdf (Internet-02).
8. Batista, L. 2009. Guía Técnica el Cultivo de Cacao en la República Dominicana. CEDAF, 12-13.
9. Zuriday S.2007. Extracción de manteca a partir de las semillas del cacao (*Theobroma cacao* L.) Utilizando dióxido de carbono como solvente en condiciones súper críticas. Tesis. Universidad Central de Venezuela.43-44.
10. <http://www.unitedcacao.com/index.php/es/corporate-profile-es/global-cocoa-market-es> (internet-03)
11. Morales J, García J, Méndez B.2012. ¿Qué sabe usted acerca de...Cacao? Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.No.4. Vol. 43, 79-80
12. Cadena Cala T, Herrera Aldila Y. 2008. Evaluación del efecto del procesamiento del cacao sobre el contenido de polifenoles y su actividad antioxidante. Tesis. Universidad Industrial de Santander.7-8
13. Garzaro D, Guerra Cedazo F, Kalvatchev Z.1998. *Theobroma cacao* L. Un nuevo enfoque para nutrición y salud. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). No 6,1-3.
14. Ortiz L, Maldonado H, Parra P y Graziani L.2006. Caracterización electroforética de las globulinas del grano fermentado de tres tipos de cacao. INCI Caracas. No.6, Vol.31.Pag1.
15. Velásquez G. 2006. Lípidos: esenciales para la salud. Fundamentos de alimentación saludable. Universidad de Antioquia. Primera edición.46-47

16. Pérez E, Álvarez C, Lares M. 2001. Caracterización física y química de granos de cacao fermentados, secos y tostados de la región de Chuao. Universidad Central de Venezuela.4-5.
17. Zimmeta P, Serrano C. 2005. Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados. Revista Española Cardio.No.12, Vol.137, 1-6.
18. www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2006/03/e_AcidosGrasos.pdf. (Internet-04).
19. Montoya Contreras O.2003. Ácidos grasos esenciales en plasma y su relación con el Trastorno del Déficit de Atención en pacientes de 7 a 18 años que acudieron al Instituto de Bienestar Integral en el periodo de enero del 2000 a agosto del 2002.Tesis. Universidad Autónoma de Nuevo León.39-40
20. Rodríguez Cruz M, Tovar M, del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. Revista de Investigación, Clínica Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. No.3, Vol.57, 457-472.
21. Basulto Marset J, Comas M, Bassols M, Baladia E.2009. Ácido esteárico y salud cardiovascular. Actividad Dietética. No.13, Vol.4, 161-172.
22. Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S.2002. el uso de lípidos estructurados en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de productos innovadores. Revista chilena de nutrición. No 2, Vol.29.
23. Valenzuela A, Ronco A. 2004. Fitoesteroles y fitoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. Revista chilena de nutrición.Vol.21, 161-169.
24. Maldonado Saavedra O, Ramírez Sánchez I, García Sánchez J, Ceballos Reyes G, Méndez Bolaina E. 2012. Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas.Vol.2.8-16.
25. Romero C, Zambrano A. 2011. Análisis de azúcares en pulpa de cacao por colorimetría y electroforesis capilar. Revista Científica UDO Agrícola. No12 Vol.4, 906-913.
26. Abarca R. 2010. Identificación de fibra dietaría en residuos de cacao (Theobroma cacao L.). Tesis. Universidad técnica particular de Loja, Loja – Ecuador.
27. Matos Chamorro A, Chambilla M. 2010. Importancia de la Fibra Dietética, sus Propiedades Funcionales en la Alimentación Humana y en la Industria Alimentaria Revista de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos.No.1, Vol.1, 4-17.
28. www.file:///C:/Users/HP/Downloads/DialnetTheobromaCacaoLUnNuevoEnfoqueParaNutricionYSalud-3233588%20(4).pdf. (internet-05).
29. Valenzuela A.2007. El chocolate un placer saludable. Revista chilena de nutrición. No 3. Vol34. Pág.1

30. Zuriday S. 2007. Extracción de manteca a partir de las semillas del cacao (*Theobroma cacao* L.) Utilizando dióxido de carbono como solvente en condiciones súper críticas. Tesis. Universidad Central de Venezuela. 43-44.
31. Badui Dergal S. 2013. Pigmentos. Química de los alimentos. Pearson. Quinta edición. 379-380.
32. <https://www.google.com.mx/search?q=estructura+basica+de+los+flavonoides> (internet-06)
33. Parra Blanco G. 2012. Farmacología de la (-)-epicatequina. Tesis. Universidad Veracruzana. 11-13.
34. Schramm D, Wang J, Holt R, Ensunsa L, Gonsalves, J. 2001. Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostacyclin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am J Clin Nutr.* No 73, Vol.1, 36-40.
35. Suazo Mercado Y. 2012. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense. Tesis. Universidad pública de navarra. 22
36. Parra Blanco G. 2012. Farmacología de la (-)-epicatequina. Tesis. Universidad Veracruzana. 11-13.
37. <https://www.google.com.mx/search?q=procesamiento+del+grano+de+cacao>. (internet-07)
38. Suazo Mercado Y. 2012. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense. Tesis. Universidad pública de navarra. Pág. 22.
39. Gil Quintero J. 2012. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Tesis. Universidad de Antioquia Medellín. 21-28.
40. Venéreo Gutiérrez J. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana medicina militar.* No. 31, Vol. 2, 26-33.
41. Fernández Larrea J, Pinent M, Bladé, M. Salvadó, M. Blay, G. Pujadas, A. Ardévol, L. 2007. Alimentos ricos en procianidinas, alimentación funcional para prevenir la aparición de síndrome metabólico. *Revista Española Obes.* No. 5, Vol. 2, 98-108
42. Yanzapanta Llambo A. 2014. Estudio de la variación de los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y grasa en almendras de cacao fino de aroma en tres diferentes zonas de producción de la Amazonía ecuatoriana. Tesis. Universidad técnica de Ambato Ecuador. 43-44.
43. Gómez Juaristi M, González Torres, Bravo L, Vaquero M, Bastida S y Sánchez Muñiz F. 2011. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutrición hospitalaria.* No. 2 Vol. 26, 289-292.
44. Suazo Mercado Y. 2012. Efecto de la fermentación y el tostado sobre la concentración polifenólica y actividad antioxidante de cacao nicaragüense. Tesis. Universidad pública de navarra. Pág. 22

45. Gil Quintero J. 2012. Estabilidad y actividad antioxidante de catequinas presentes en cacaos colombianos durante los procesos de pre e industrialización. Tesis. Universidad de Antioquia Medellín. 21-28.
46. Badui Dergal S. 2013. Agua. Pearson. Química de los alimentos. Quinta edición. 17-21.
47. www.alimentosargentinos.gob.ar/HomeAlimentos/Tecnologia/tecnologia/Ficha_03_Liofilizados.pdf. (Internet -0-8).
48. González Montoya M. 2012. Estudio de la composición química y efecto hipocolesterolémico e hipolipidémico *in vivo* de un aguacate liofilizado. Tesis. UMSNH. Pág. 17.
49. Badui Dergal S. 2013. Lípidos. Química de los alimentos. Pearson. Quinta edición. 259-260.
50. Gutiérrez Maydata A. 2002. Chocolate, Polifenoles y Protección a la Salud. Acta farmacéutica bonaerense. No. 2, Vol. 21, 149-150
51. Reeves P. 1997. Symposium: Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research. U.S. Department of agriculture. 838-841.
52. AOAC International. 2000. Official methods of analysis of AOAC International. 17ª edición. 934.01
53. Prosky. (1998). Método enzimático.
54. NMX-F-490-1999-NORMEX. Alimentos-Aceites-Grasas. Determinación de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases.
55. Sosa Martínez R, Tenori E., Marrero O, Aguila E, Camacho S, Morales A. 2008. Determinación de compuestos fenólicos, metales y su efecto sobre el potencial antioxidante y tóxico en mieles procedente de la especie *Apis mellifera*. Universidad Central. Santa Clara Cuba. Pág. 2.
56. <http://sea.umh.es/files/2011/07/eutanasia2.pdf>. (Internet-09).
57. Zapata S, Tamayo A, Rojano A. 2015. Efecto del Tostado Sobre los Metabolitos Secundarios y la Actividad Antioxidante de Clones de Cacao Colombiano. Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín, vol. 68, núm. 1, 7497-7507.
58. López cruz I, Pardo M, Dosda A, Correa m. 2011. Comparación de dosis altas de las metilxantinas cafeína y teofilina en efectos motores y ansiogénicos. Tesis. Universidad de la Rioja. 1015-1017.
59. Aranda J, Villacrés J, Mego R, Delgado H. 2014. Efecto de los extractos de *Geranium ayavacense* W. (Pasuchaca) sobre la glicemia en ratas con diabetes mellitus experimental. Rev. Perú Med Exp Salud Pública. Vol. 2, No 31, 261-265