



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA DEL  
*Theobroma cacao*, PARA LA FORMULACIÓN DE UN PROTECTOR  
SOLAR”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**  
**TIPO: TRABAJO EXPERIMENTAL**

**Previo a la obtención del Título de:**  
**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: JOHANNA GABRIELA ROMERO ARMAS**  
**TUTORA: Dra. SUSANA ABDO**

**Riobamba-Ecuador**  
**2018**

**©2018, Johanna Gabriela Romero Armas**

Se autoriza la reproducción parcial o total, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que: El trabajo de Titulación de Tipo Experimental: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FOTOPROTECTORA DEL *Theobroma cacao*, PARA LA FORMULACIÓN DE UN PROTECTOR SOLAR”** de responsabilidad de la señorita egresada Johanna Gabriela Romero Armas, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dra. Susana Abdo López., M.Sc

**DIRECTOR DE TRABAJO  
DE TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

BQF. Diego Vinuesa Tapia., M.Sc.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Yo, Johanna Gabriela Romero Armas, declaro que el contenido, ideas, doctrinas que se presentan en este trabajo de titulación son de mi responsabilidad, los resultados son verídicos y el patrimonio intelectual de este trabajo de titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

---

**Johanna Gabriela Romero Armas**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo va dedicado a Dios por darme la fortaleza de seguir adelante pese a las adversidades presentadas durante este proceso académico.

A mis padres y hermanos por ser ese apoyo de lucha constante y formar parte de mi diario vivir.

A mi abuelita Lola por cuidarnos cuando más lo necesitamos y enseñarnos a ser buenos hijos, a mi abuelito Rafael que él seguro donde está, estará muy feliz de verme cumplir mi sueño más anhelado.

A mis sobrinas Lola y Julia, aunque la distancia nos separe son mi inspiración y mi motivación.

A Gabriel por darme ánimos, consejos, su cuidado, cariño y paciencia durante todo este tiempo juntos.

A mi cuñado José Manuel y a todos mis seres queridos que han sido parte de esta trayectoria.

Johanna

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero empezar agradeciendo a Dios por darme la vida, paciencia y la fuerza en momentos de debilidad para permitirme poder llegar hasta este momento de gran importancia en mi vida.

A mis padres Milton y Consuelo por su apoyo en todo momento, por enseñarme a ser buena hija y una mujer responsable y luchadora.

A mis abuelitos Rafael(+) y Lola por estar pendientes en nuestra niñez brindándonos sus atenciones, cuidados y cariño.

A mi hermana Jessica por ser una mujer fundamental en mi vida compartiendo momentos y travesuras maravillosas desde nuestra niñez, a mí hermano Jesús por ser mi protector, mi compañía entre risas y llantos.

A mis niñas, Lola y Julia porque son la alegría del hogar y aunque los miles de kilómetros nos separen, siempre están presentes y quiero darles ese ejemplo de amor y constancia en todo lo que uno se propone.

A mi cuñado José Manuel porque no es solamente un cuñado, sino más que un amigo un hermano quien nos ha consentido y apoyado en todo momento.

A ti Gabriel, gracias por tenerme paciencia, por tu amor incondicional y ser mi apoyo constante en los buenos y malos momentos pero sobre todo en la elaboración de este trabajo y no dejarme desmayar en los malos ratos, por eso y más gracias amor.

A mis amigos y compañeros que formaron parte de este camino, compartiendo grandes momentos que quedan en nuestro corazón.

Mi agradecimiento profundo a la Dra. Susana Abdo y al BQF. Diego Vinuesa por su guía, buena vibra, tiempo y conocimientos para desarrollar el presente trabajo de titulación.

Johanna

## CONTENIDO

<b>CONTENIDO</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Radiación solar</b>	<b>4</b>
<i>1.1.1 Radiación ultravioleta</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2 Factores que afectan la intensidad de la radiación solar</i>	<i>5</i>
<i>1.1.3 Índice ultravioleta</i>	<i>5</i>
<b>1.2 La piel</b>	<b>6</b>
<i>1.2.1 Estructura de la piel</i>	<i>6</i>
<i>1.2.2 Función de la piel</i>	<i>7</i>
<i>1.2.3 Melanocitos</i>	<i>7</i>
<i>1.2.4 Melanina</i>	<i>7</i>
<i>1.2.5 Función de la melanina</i>	<i>7</i>
<i>1.2.6 Tipos de pigmentación</i>	<i>8</i>
<b>1.3 Fototipos cutáneos</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Cáncer de piel</b>	<b>9</b>
<i>1.4.1 Tipos de cáncer</i>	<i>10</i>
<i>1.4.1.1 Melanoma</i>	<i>10</i>
<i>1.4.1.2 Cáncer de células basales</i>	<i>10</i>
<i>1.4.1.3 Cáncer de células escamosas</i>	<i>11</i>
<i>1.4.2 Fotoprotección</i>	<i>11</i>
<i>1.4.3 Fotoprotectores o filtros solares</i>	<i>12</i>
<i>1.4.4 Compuestos fotoquímicos</i>	<i>13</i>
<i>1.4.4.1 Radical libre</i>	<i>13</i>
<i>1.4.4.2 Antioxidantes</i>	<i>14</i>
<i>1.4.4.3 Polifenoles</i>	<i>14</i>
<b>1.5 Familia de <i>Malvaceae</i></b>	<b>14</b>

<b>1.6 <i>Theobroma cacao</i></b>	<b>15</b>
<b>1.6.1 <i>Clasificación taxonómica</i></b>	<b>16</b>
<b>1.6.2 <i>Descripción botánica</i></b>	<b>16</b>
<b>1.6.3 <i>Componentes importantes</i></b>	<b>16</b>
<b>1.6.4 <i>Usos</i></b>	<b>16</b>
<b>1.6.5 <i>Actividades biológicas comprobadas</i></b>	<b>18</b>
<b>CAPITULO II</b>	
<b>2. MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Lugar de investigación</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Recolección del material vegetal</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Identificación del Material Vegetal</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Material vegetal</b>	<b>19</b>
<b>2.5 Equipos y reactivos</b>	<b>19</b>
<b>2.5.1 <i>Equipos</i></b>	<b>19</b>
<b>2.5.2 <i>Reactivos</i></b>	<b>20</b>
<b>2.6 Técnicas y métodos</b>	<b>21</b>
<b>2.6.1 <i>Secado y molienda de la materia vegetal</i></b>	<b>22</b>
<b>2.6.1.1 <i>Secado</i></b>	<b>22</b>
<b>2.6.1.2 <i>Molienda</i></b>	<b>22</b>
<b>2.6.2 <i>Control de calidad</i></b>	<b>22</b>
<b>2.6.2.1 <i>Determinación de cenizas totales</i></b>	<b>22</b>
<b>2.6.2.2 <i>Determinación de cenizas solubles en agua</i></b>	<b>23</b>
<b>2.6.2.3 <i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i></b>	<b>24</b>
<b>2.6.2.4 <i>Determinación del contenido de humedad (Método gravimétrico)</i></b>	<b>24</b>
<b>2.6.3 <i>Tamizaje fitoquímico</i></b>	<b>25</b>
<b>2.6.4 <i>Obtención del extracto alcohólico</i></b>	<b>27</b>
<b>2.6.4.1 <i>Determinación de los requisitos organolépticos</i></b>	<b>27</b>
<b>2.6.4.2 <i>Determinación de densidad relativa</i></b>	<b>27</b>
<b>2.6.4.3 <i>Determinación del índice de refracción</i></b>	<b>28</b>
<b>2.6.4.4 <i>Determinación del pH</i></b>	<b>28</b>
<b>2.6.4.5 <i>Determinación de sólidos totales</i></b>	<b>28</b>

<b>2.6.5 Obtención del extracto seco del <i>Theobroma cacao</i></b>	<b>29</b>
<b>2.6.6 Cuantificación de fenoles totales</b>	<b>29</b>
<b>2.6.7 Cuantificación de flavonoides totales</b>	<b>30</b>
<b>2.6.8 Ensayo antioxidante por el método DPPH'</b>	<b>31</b>
<b>2.6.9 Determinación del factor de protección solar (FPS)</b>	<b>31</b>
<b>2.6.10 Determinación de las cantidades de los excipientes para formular el protector solar</b>	<b>32</b>
<b>2.6.11 Método de elaboración del protector solar</b>	<b>33</b>
<b>2.6.12 Control de calidad del producto terminado</b>	<b>33</b>
2.6.12.1 Descripción organoléptica	33
2.6.12.2 Controles fisicoquímicos	33
2.6.12.3 Control microbiológico	34
2.6.12.4 Control de estabilidad	34
<b>CAPITULO III</b>	
<b>3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Control de calidad de la droga cruda de granos <i>Theobroma cacao</i></b>	<b>35</b>
<b>3.2 Análisis cualitativo</b>	<b>36</b>
3.2.1 Tamizaje fitoquímico	36
<b>3.3 Parámetros de calidad del extracto</b>	<b>38</b>
<b>3.4 Cuantificación de fenoles totales</b>	<b>39</b>
<b>3.5 Cuantificación de flavonoides totales</b>	<b>40</b>
<b>3.6 Ensayo de Actividad Antioxidante</b>	<b>41</b>
<b>3.7 Zonas de absorción ultravioleta del extracto etanólico de <i>Theobroma cacao</i></b>	<b>41</b>
<b>3.8 Determinación del Factor de protección solar (FPS) <i>in vitro</i></b>	<b>42</b>
<b>3.9 Control de calidad del producto final</b>	<b>44</b>
3.9.1 Descripción organoléptica	44
3.9.2 Control fisicoquímico	44
3.9.3 Análisis microbiológico	45
3.9.4 Estabilidad acelerada	46
<b>3.10 Análisis estadístico</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>

**RECOMENDACIONES**

**49**

---

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1</b>	Valores del índice ultravioleta	7
<b>Tabla 2-1</b>	Taxonomía del <i>Theobroma cacao</i>	17
<b>Tabla 3-1</b>	Usos del <i>Theobroma cacao</i>	17
<b>Tabla 1-2</b>	Equipos utilizados para el ensayo fotoprotector	20
<b>Tabla 2-2</b>	Reactivos utilizados para el desarrollo de los ensayos	21
<b>Tabla 3-2</b>	Excipientes para las formulaciones de la crema protectora al 100%	33
<b>Tabla 1-3</b>	Resultados de parámetros de calidad	36
<b>Tabla 2-3</b>	Resultados del tamizaje fitoquímico de semilla de <i>Theobroma cacao</i>	37
<b>Tabla 3-3</b>	Parámetros de calidad del extracto de semillas de <i>Theobroma cacao</i>	39
<b>Tabla 4-3</b>	Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría de	40
<b>Tabla 5-3</b>	Cuantificación de fenoles totales en extracto metanólico de <i>Theobroma cacao</i>	40
<b>Tabla 6-3</b>	Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría	41
<b>Tabla 7-3</b>	Cuantificación de flavonoides totales en extracto metanólico de <i>Theobroma cacao</i>	41
<b>Tabla 8-3</b>	Resultados del IC <sub>50</sub>	42
<b>Tabla 9-3</b>	Resultados del Factor de Protección Solar <i>in vitro</i> del <i>Theobroma cacao</i> y protector solar comercial (Suncare FPS100)	43
<b>Tabla 10-3</b>	Descripción organoléptica de las formulaciones del protector solar de <i>Theobroma cacao</i>	44
<b>Tabla 11-3</b>	Descripción del control fisicoquímico del protector solar de <i>Theobroma cacao</i>	45
<b>Tabla 12-3</b>	Descripción del control microbiológico del protector solar de <i>Theobroma cacao</i>	45
<b>Tabla 13-3</b>	Descripción del control de estabilidad del protector solar de <i>Theobroma cacao</i>	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-1</b>	La piel	7
<b>Figura 2-1</b>	Escala de Fitzpatric	8
<b>Figura 3-1</b>	Tipos de melanoma	10
<b>Figura 4-1</b>	Cáncer de células basales	11
<b>Figura 5-1</b>	Cáncer de células escamosas	11
<b>Figura 6-1</b>	Distribución geográfica de la familia Malvaceae	15
<b>Figura 7-1</b>	<i>Theobroma cacao</i>	15
<b>Figura 1-2</b>	Protocolo de investigación	21
<b>Figura 2-2</b>	Protocolo de obtención de extractos	25
<b>Figura 3-2</b>	Protocolo para realizar tamizaje fitoquímico en extracto etéreo o hexánico	26
<b>Figura 4-2</b>	Protocolo para realizar tamizaje fitoquímico en extracto alcohólico	26
<b>Figura 5-2</b>	Protocolo para realizar tamizaje fitoquímico en extracto acuoso	26
<b>Figura 6-2</b>	Fundamento de la reacción de Folin – Ciocalteu	30
<b>Figura 7-2</b>	Fundamento de la reacion de Tricloruro de Aluminio	30
<b>Figura 8-2</b>	Valores de EExI preestablecidos para la ecuación de Mansur	32

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Fotografía 1-2</b>	Secado de semillas	22
<b>Fotografía 2-2</b>	Cenizas totales	23
<b>Fotografía 3-2</b>	Extracto alcohólico	27
<b>Fotografía 4-2</b>	Sólidos totales	28
<b>Fotografía 5-2</b>	Extracto seco	29
<b>Fotografía 1-3</b>	Picos del barrido espectrofotométrico del extracto alcohólico del <i>Theobroma cacao</i>	41

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo A</b>	Recolección y proceso de secado de las semillas de <i>T. cacao</i>
<b>Anexo B</b>	Extracto obtenido de las semillas de cacao y resultado fitoquímico
<b>Anexo C</b>	Concentración y extracto seco del cacao
<b>Anexo D</b>	Muestras de fenoles, flavonoides y antioxidante
<b>Anexo E</b>	Formulaciones fotoprotectoras
<b>Anexo F</b>	Prueba modelo lineal general multivariado para el análisis de pH
<b>Anexo G</b>	Prueba modelo lineal general multivariado para el análisis de extensibilidad

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de titulación fue evaluar mediante ensayos *in vitro* la actividad fotoprotectora del *Theobroma cacao* para la formulación de un protector solar. Una vez recolectado el material vegetal se secó y trituró. Se realizó el control de calidad de la droga vegetal. El tamizaje fitoquímico confirmó la presencia de compuestos fenólicos y grasos. Para obtener el extracto alcohólico, las semillas de cacao se maceraron con etanol al 96%, se concentró en rotavapor bajo condiciones controladas. Los flavonoides se analizaron espectrofotométricamente a través del método del Tricloruro de Aluminio, obteniendo los siguientes resultados:  $30819,80952 \pm 125,3674$  mg Eq Q/100mg de extracto seco de semillas. La determinación de fenoles se realizó por el método de Folin-Ciocalteu obteniendo el resultado de  $46966,666 \pm 577,350$  mg Eq GAE/100 mg de extracto seco de semillas. El extracto seco presentó una capacidad captadora de radicales libres a un  $IC_{50}$  de  $812,13 \mu\text{g/ml}$ , el cual se evaluó por el método de DPPH°. Se evaluó la actividad fotoprotectora del extracto seco de las semillas del *Theobroma cacao* y de las formulaciones fotoprotectoras mediante la determinación del Factor de Protección Solar (FPS), aplicando la ecuación de Mansur. Se realizó tres formulaciones a las cuales se les realizó el control de calidad, obteniendo como resultado un valor de FPS de 6 a 12, pH con intervalos de 5.5 a 5.9, una inocuidad en condiciones favorables y aptas para la piel humana como lo indica la norma NTE INEN 2867 y demostraron estabilidad durante el periodo de 30 días expuestas a una temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  y humedad de aproximadamente 75%. Se concluyó en base al control de calidad del extracto alcohólico y las formulaciones fotoprotectoras, por lo que se recomienda completar la investigación con pruebas de toxicidad y genotoxicidad y así poder certificar su eficacia y seguridad.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA>, <CACAO (*Theobroma cacao*)>, <FOTOPROTECCIÓN>, <RADIACIÓN UVB>, <FORMULACIÓN PROTECTOR SOLAR>

## SUMMARY

The aim of this degree work was to evaluate, through in vitro tests, the photoprotective activity of *Theobroma cacao* for the formulation of a sunscreen. Once the plant material was collected, it was dried and crushed. Quality control of the vegetable drug was carried out. Phytochemical screening confirmed the presence of phenolic and fatty compounds. To obtain the alcoholic extract, the cacao seeds were macerated with 96% ethanol, concentrated in rotary evaporator under controlled conditions. The flavonoids were analyzed spectrophotometrically through the Aluminum Trichloride method, obtaining the following results:  $30819.80952 \pm 125.3674$  mg Eq Q / 100mg of dry seed extract. The determination of phenols was carried out by the Folin-Ciocalteu method obtaining the result of  $46,966,666 \pm 577,350$  mg Eq GAE / 100 mg of dry seed extract. The dry extract showed a free radical scavenging capacity at an  $IC_{50}$  of  $812.13 \mu\text{g/ml}$ , which was evaluated by the DPPH<sup>0</sup> method. The photoprotective activity of the dry extract of the *Theobroma cacao* seeds and the photoprotective formulations were evaluated by determining the Sun Protection Factor (SPF), applying the Mansur equation. Three formulations were made to which the quality control was carried out, obtaining as a result an SPF value of 6 to 19, pH with intervals of 5.5 to 5.9, a safety under favorable conditions and suitable for human skin as indicated by the NTE INEN 2867 standard and showed stability during the period of 30 days exposed to a temperature of 40°C and humidity of approximately 75%. It was concluded based on the quality control of the alcoholic extract and the photoprotective formulations, so it is recommended to complete the investigation with toxicity and genotoxicity tests and thus be able to certify its efficacy and safety.

**Keywords:** <BIOCHEMISTRY>, <CACAO (*Theobroma cacao*)>, <PHOTOPROTECTION>, <UVB RADIATION>, <SUNSCREEN FORMULATION>

## INTRODUCCIÓN

Las actividades al aire libre asociadas con la exposición al sol, proporciona bienestar físico y psicológico pero los efectos de la radiación ultravioleta (RUV) causan eritemas, hiperpigmentación, fotoenvejecimiento e incluso fotocarcinogénesis, debido que en los últimos años se ha incrementado la intensidad de los niveles de RUV en el mundo a las horas comprendidas entre las 10h00 hasta las 16h00 (Lim, 2017: pp.89).

Millones de personas toman vacaciones cada año exponiéndose a RUV de alta dosis a corto plazo, sin embargo al sol no se puede evitar ya que es primordial para la síntesis cutánea de vitamina D, aunque es beneficioso para la producción de esta vitamina, así mismo es perjudicial ya que causa daño al ADN epidérmico ocasionando dímeros de ciclobutano pirimidina (CDP), lo que origina una lesión muy importante relacionado con las mutaciones del p53 generándonos cáncer de piel (Petersen *et al.*, 2014: pp. 2806-2807).

Para reducir los efectos perjudiciales que causa exponerse al sol, se necesita practicar la fotoprotección, que consiste en buscar sombra, usar sombrero de ala ancha, gafas de sol e incluso ropa fotoprotectora y el uso de protector solar con el factor de protección solar (FPS) sea de amplio espectro (Sambandan and Ratner, 2011: pp. 748).

El uso de un producto tópico es parte de la estrategia general para la prevención de fotocarcinogénesis y fotoenvejecimiento, el nivel de protección alcanzable cuando se usa estos productos debe ser principalmente un valor que refleje la protección del rango UV-B y UV-A ya que son los que provocan efectos dañinos sobre la piel (Couteau, Diarra and Coiffard, 2016: pp. 210).

Con el desarrollo de protectores solares eficaces, cosméticamente aceptables, ha llegado a ser posible un acuerdo con nuestros deseos competidores como disfrutar de ciertas actividades de ocio y laborales al aire libre, evitando quemaduras de sol, arrugas y cánceres de piel. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad generalizada de protectores solares de marcas comerciales reconocidas, se sigue tratando las quemaduras del sol y sus secuelas en números cada vez mayores (Kaplan, 2017: pp. 173).

En el Ecuador según SOLCA (2018: <http://solca.ec/>) en los últimos años se ha registrado la tasa más alta de personas con cáncer de piel, es decir que de cada 100 mil habitantes 4 a 6 de género masculino padecen esta enfermedad, mientras que el género femenino va de 2 a 3. Aunque en el

año transcurrido se presenta un total de 650 casos nuevos a nivel nacional; cada vez es más frecuente este tipo de cáncer ya que no es solo de personas adultas sino también en jóvenes de 20 a 30 años de edad, por eso hay que tomar en cuenta el riesgo al que se está expuesto a la RUV sin protección.

Por esta razón las investigaciones han avanzado debido a la situación que se ha generado en el país y el mundo entero, a causa del incremento de las estadísticas en cuanto al cáncer de piel, por eso se ha llevado a cabo el estudio de extractos de plantas con propiedades fotoprotectoras y antifotocarcinogénicas para el desarrollo de protectores solares naturales para que no afecte la atmosfera ni la vida marina (Lim, Arellano and Stengel, 2017: pp. S91).

Ciertamente ha llegado a ser necesario diseñar productos que protejan la piel contra el daño insidioso causado por la exposición excesiva al sol, con la ventaja de saber aprovechar los metabolitos extraídos de ciertas plantas que posean la propiedad de fotoprotección, como los polifenoles y antioxidantes en donde varios estudios recalca que contrarrestan naturalmente los efectos nocivos del sol (Kaur, Kapila and Agrawal, 2017: pp. 272).

Además la comunidad científica es actualmente sensible al impacto del estrés oxidativo en todas las áreas de la salud y, como se sabe que la radiación UV es el factor más eficaz en que induce daño oxidativo a las células de la piel, las sustancias activas antioxidantes son buscadas para aplicaciones tópicas y sistémicas (Gálvez, 2010: pp. 198).

Por lo tanto, uno de las plantas con efecto fotoprotector es el *Theobroma cacao* debido a sus contenido alto en polifenoles parecidos a los vegetales los cuales otorgan a su vez una resistencia de peroxidación en las grasas presentes en el cacao; así mismo posee un mecanismo de prevención hacia algunas enfermedades a causa del estrés oxidativo como un ejemplo el fotoenvejecimiento (Gutiérrez, 2002: pp. 149-150).

*Theobroma cacao* es un producto muy comercializado a nivel mundial, Ecuador tiene grandes hectáreas de sembríos de este producto tanto en la región Costa como en la Amazonía, hay que explotar sus propiedades aunque mucha gente desconoce de los uso que puede poseer el mismo; estudios realizados demuestran que presenta un efecto estimulante en la producción de glóbulos rojos en ratas, el aceite de las semillas en ratones hembras un efecto estrogénico e incluso en los extractos acuosos de la corteza y semillas tienen un efecto antiviral contra el virus herpes tipo 2 (Ochoa, 2016: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>).

El rol del Bioquímico Farmacéutico es fundamental para el desarrollo de productos cosmeceúticos, fitomedicamentos entre otros, y que es de gran importancia para vincularse hacia nuevas investigaciones en cuanto a plantas nativas para tratar este problema social que está afectando el país sobre todo en regiones andinas; de la misma manera lograr mejorar la calidad de vida de la población como recalca el Objetivo 3 del Plan del Buen Vivir.

Este trabajo de titulación se basa en solucionar el problema de la educación sobre la falta de protección solar, que está afectando a la población no solo de las regiones andinas del Ecuador sino a nivel mundial, es decir que se trata de que este producto sea de fácil acceso, de bajo precio, de fabricación natural que no contenga excipientes contaminantes que no afecten a la atmosfera mucho menos a la vida marina. Ofreciendo así a la población productos seguros y eficaces.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad fotoprotectora del *Theobroma cacao*, para la formulación de un protector solar.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la concentración de metabolitos cromóforos del *Theobroma cacao* responsables de la absorción de UV-A UV-B (fenoles, flavonoides, antioxidantes)
- Valorar la capacidad fotoprotectora del extracto de *Theobroma cacao*.
- Elaborar un protector solar basado en el extracto que presenten mayor capacidad fotoprotectora.

# CAPITULO I

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Radiación solar

En el sol se da el proceso de unión nuclear lo cual da como resultado la energía solar, la misma que promueve el movimiento en el medio ambiente y que cuando llega a la superficie terrestre es la energía mayormente consumida por la humanidad (AEMeT, 2015: pp. 1).

La radiación solar emite varias longitudes de onda, pero su máximo se presenta en la zona de luz visible. La luz visible tiene algunos colores que al ligarse dan lugar a una luz blanca, por lo que adquiere ese nombre y por lo tanto este grupo de longitudes de onda provenientes del sol dan lugar al espectro solar donde se encuentran los rayos ultravioletas (Inzunza, 2013: pp. 57).

#### *1.1.1 Radiación ultravioleta*

La zona ultravioleta UV se encuentra en el rango espectral en un intervalo de 100 a 400 nm los cuales se divide en (OMS, 2014: pp. 5):

- UV-A de 315 a 400 nm
- UV-B de 280 a 315 nm
- UV-C de 100 a 280 nm

Los rayos UV-A es absorbida por la atmósfera en menor cantidad, los rayos UV-B es un aproximado del 90% de la radiación por lo que causa precaución sobre los efectos en la salud humana y medio ambiental; mientras que los rayos UV-C es absorbida por el ozono, el oxígeno y el dióxido de carbono (INAMHI, 2017: <http://www.serviciometeorologico.gob.ec>).

El único beneficio ampliamente establecido de RUV en la piel es la fotosíntesis de la vitamina D que se inicia por la conversión inducida por UVB de 7-deshidrocolesterol epidérmico en previtamina D 3 (Young, 2017. pp:101).

### ***1.1.2 Factores que afectan la intensidad de la radiación solar***

Cuando los rayos del sol atraviesan la atmósfera ocurre la aparición de ciertos factores que influyen en la intensidad de la radiación solar, los cuales son (WMO, 2018: <http://www.wmo.int/pages/prog/arep/gaw/UV-radiation.html>):

- **Altura del sol.-** Mientras más alto se encuentre el sol en el cielo mayor será la radiación, esto varía en diferentes horas del día y estaciones del año, excepto lugares tropicales donde el sol al mediodía llega a su máxima altura pero solo ocurre en la estación veraniega.
- **Latitud.-** La radiación UV aumenta cuando se encuentra muy cercano al Ecuador.
- **Nubosidad.-** Existe una dependencia del clima por su favorabilidad en absorber las radiaciones, aunque esto no asegure una total protección ya que los rayos UV pueden atravesar.
- **Altitud.-** A una mayor altitud mayor absorción de radiación.
- **Oblicuidad.-** La intensidad de radiación depende del ángulo que incide en la superficie terrestre, que a su vez tiene influencia de la hora, estación y latitud del lugar.
- **Reflexión por el suelo.-** Depende de la existencia de varios tipos de suelo que inclinan la radiación solar como puede ser la nieve, arena seca, agua, hierba e incluso el asfalto.

### ***1.1.3 Índice ultravioleta***

El índice ultravioleta UVI es la escala donde se puede medir la intensidad de la radiación UV solar, se encuentra con un valor mayor a cero y cuanto más alto sea este valor aumenta la posibilidad de emerger lesiones en la salud humana (OSAB, 2000: pp. 2-3).

La escala que se presenta en la tabla 1.1 tiene como finalidad que las personas reconozcan en qué nivel la exposición solar es perjudicial para la salud, puesto que es donde se recomienda total protección antes de exponerse al sol, y que existen personas que son más vulnerables a adquirir mayores lesiones como el cáncer de piel (OMS, 2014b: pp. 7).

**Tabla 1. 1 Valores del índice ultravioleta**

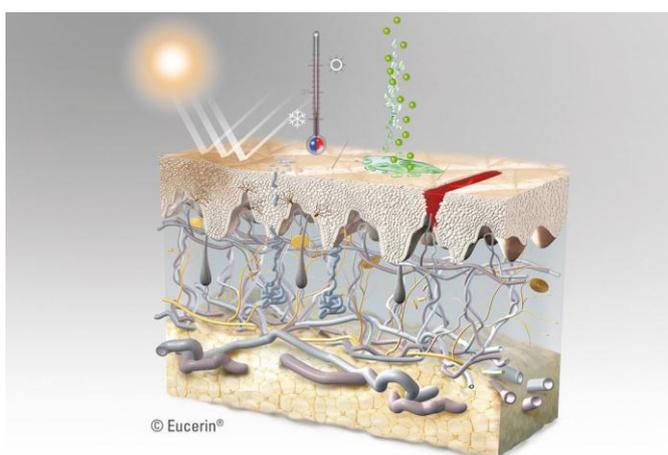
CATEGORÍA DE EXPOSICIÓN	INTERVALO DE VALORES DEL UVI
BAJA	< 2
MODERADA	3 a 5
ALTA	6 a 7
MUY ALTA	8 a 10
EXTREMADAMENTE ALTA	+ 11

Fuente: (WMO, 2018b: <http://www.wmo.int/pages/prog/arep/gaw/UV-radiation.html>)

Realizado por: Johanna Romero

## 1.2 La piel

La piel es considerada de mucha importancia en el diario vivir, ya que posee una propiedad de defensa ante microorganismos como virus y bacterias así como también interviene en el balance de líquidos y electrolitos que ayudan a proteger de las RUV y a mantener la temperatura corporal (Eucerin, 2016: pp. 1).



**Figura. 1-1:** La piel

Fuente: (Eucerin, 2016: pp.1)

### 1.2.1 Estructura de la piel

La piel es un órgano que histológicamente contiene tres capas primordiales (SMG, 2014: pp. 2-4):

- Epidermis.- Es la capa que protege de todo agente nocivo externo y de la disminución de líquidos. A su vez está constituida por cuatro tipos de células que son: Queratinocitos, Melanocitos, Células de Merckel y Células de Langerhans.

- Dermis.- Es la capa media aquí se encuentra el colágeno y elastina, compuestos de gran necesidad para mantener la fuerza y flexibilidad de la piel.
- Hipodermis.- Es la capa más interna con irrigación sanguínea y nerviosa que además contiene células adiposas y septos tisulares.
- Anexos: pelos, uñas y glándulas sudoríparas.

### ***1.2.2 Función de la piel***

La función de la piel es actuar como escudo entre lo externo e interno que existe alrededor del cuerpo, tanto así como barrera, regulador y de regeneración. Como barrera ante la presión, golpes, abrasiones, sustancias químicas, bacterias y virus; como regulador frente a factores como el frío, calor, pérdida de líquidos y radiaciones; y regenerador en caso de heridas y la vitamina D (CACE, 2016: pp. 6).

### ***1.2.3 Melanocitos***

Los melanocitos se encuentran en la epidermis y son células especializadas que producen un pigmento llamado melanina, que da el color característico de la piel la cual cumple con la función de protección ante los RUV (CACE, 2016b: pp. 2).

### ***1.2.4 Melanina***

La melanina es un biopolímero con un esqueleto químico complejo y la responsable de proporcionar el color a la piel y cabello. Existen dos tipo de melanina (OFFARM, 2005: pp. 116):

- Eumelanina.- Otorga el color pardo o negro, que gracias a su contenido de azufre da coloraciones oscuras.
- Feomelanina.- Da el pigmento amarillo o rojo-pardusco que participan con el azufre en mayor cantidad por lo que es causante de coloraciones claras.

### ***1.2.5 Función de la melanina***

La melanina también cumple con ciertas funciones como son (OFFARM, 2005b: pp. 117):

- Color de la piel y del cabello.- En las diferentes razas todo dependerá de la cantidad y calidad de melanina que produzca el organismo para determinar la gama de colores.
- Protección natural contra el sol.- La eumelanina por su gran capacidad de absorber los RUV posee una mejor defensa que la feomelanina. Y dentro del espectro la luz UV es la que perjudica la piel.

### 1.2.6 Tipos de pigmentación

Dentro de los tipos de pigmentación están dos (OFFARM, 2005c: pp. 118):

- Homogénea.- Se produce en la piel sin alteraciones y da dependencia para realizar el bronceado, lo cual se denomina un fototipo cutáneo.
- Heterogénea.- Se produce en la piel con alteraciones de la pigmentación provocadas por el sol.

### 1.3 Fototipos cutáneos

Según el tipo de piel de algunas personas puede producir más cantidad de melanina y con la ayuda de la irrigación sanguínea determinan el color de piel de cada uno. Siendo así denominándole al fototipo cutáneo como la capacidad de adaptación que posee cada persona al nacer ante el sol. Es decir, mientras más baja sea esta capacidad menor será los efectos nocivos sobre la piel a causa de la exposición al sol (Guavita, 2014: pp. 31).

Según la figura 1-2 el fototipo de piel se describe mediante la escala de Fitzpatrick.

Fototipo	Descripción piel	Tendencia quemadura solar	Bronceado
I	Piel muy clara, lechosa, de tipo céltico o casi albino, con pecas abundantes. Pelirrojos, ojos azules.	Con facilidad	Nulo
II	Piel blanca que tras mucha exposición solar adquiere un ligero tono café con leche, con pecas. Pelo rubio o pelirrojo, ojos azules o verdes.	Con facilidad	Ligero
III	Piel clara, caucásica (europeos), que con las primeras exposiciones solares se producen quemaduras pero en un par de semanas adquieren un tono bronceado. Pelo castaño.	Con cierta facilidad	Claro
IV	Piel clara, similar al III, pero que en unos pocos días adquiere bronceado. Pelo castaño oscuro.	Requiere exposición intensa y mantenida	Oscuro, con facilidad
V	Piel morena, con cierto tono oscuro natural (hindúes, indios americanos, ...). Pelo castaño muy oscuro.	Requiere exposición solar muy intensa	Muy oscuro, Muy fácilmente
VI	Piel negra. Pelo negro.	Nunca	Negro, Siempre

**Figura. 2-1:** Escala Fitzpatrick

Fuente: (HLSUN, 2015: pp.1)

Es necesario definir el fototipo de piel para estimar el peligro de los efectos nocivos como el tiempo de respuesta, es decir que en el momento de la auscultación al paciente sobre su reacción cutánea ante la luz solar es necesario darle a conocer el enfrentamiento de la piel indefensa al no usar protector solar (HI.SUN, 2015b: pp.2).

#### **1.4 Cáncer de piel**

El cáncer se produce cuando las células anormales crecen de manera desmandada en algún lugar del organismo, que a su vez pueden trasladarse a otros sitios donde logra formar tumores que pueden ser benignos o malignos, cuando los malignos reemplazan a un tejido normal produce una metástasis (ACS, 2017: pp.1).

En los últimos tiempos el cáncer de piel es más común que los otros cánceres, por suerte la mayoría de cánceres de piel son de crecimiento lento, fácil de reconocer y de un tratamiento factible cuando se detecta a tiempo (ACS, 2017: <https://www.cancer.org>).

Existen varias causas por las que la población están propensos a adquirir cáncer de piel, en las que incluyen (Mandal, 2017: pp. 1-5):

- Exposición a la luz solar.- Es el de mayor riesgo, debido a la elevada RUV que emite el sol causando daños en el DNA.
- Exposición a lámparas solares o cabinas de curtimiento.- Los jóvenes deben evitar exponerse a fuentes artificiales de RUV ya que aumenta el riesgo antes de los 30 años.
- Genéticos.- Aumenta el riesgo cuando existe antecedentes de pigmentosum del xeroderma o del síndrome del carcinoma de la célula básica, y son personas más sensibles al sol.
- Edad y sexo.- Aunque para el cáncer no hay distinción de edad y sexo, se dice que los hombres son más suspicaces al cáncer de piel melanómicos y no melanómicos, afecta a personas jóvenes y va en aumento con la edad.
- Raza.- Son más vulnerables las personas de piel blanca a diferencia que las personas de color, ya que su pigmento tiene un efecto protector.

- **Medicación.-** Existe enfermedades en las cuales se administran medicamentos que debilitan la piel, dejándola sensible ante la exposición solar y aumentando la posibilidad de adquirir cáncer.

### ***1.4.1 Tipos de cáncer***

Es importante conocer qué tipo de cáncer adquirió la persona, para que se pueda dar un pronóstico y tratamiento adecuado ya que existen tres tipos de cáncer los cuales son melanoma, cáncer de células basales y cáncer de células escamosas (ACS, 2017b: pp.1).

#### ***1.4.1.1 Melanoma***

Es el tipo de cáncer de piel menos común que se produce a causa de los melanocitos, el cual puede ocasionar un crecimiento benigno los cuales se les denomina lunares. Los primeros indicios con los que se puede identificar un melanoma son los cambios de color o forma de los lunares ya presentes, sin embargo es el más peligroso porque presenta un melanoma nodular al cual se lo reconoce mediante una elevación por encima de la superficie de la piel, duro al tacto y aumento de tamaño (ACS, 2016: [www.cancer.org](http://www.cancer.org)).



**Figura. 3-1.** Tipos de melanoma

**Fuente.** (SCF, 2018: <https://www.skincancer.org/>)

#### ***1.4.1.2 Cáncer de células basales***

Las células basales se encuentran en la capa basal y el cáncer de estas células basales frecuentaba en personas de edad media o avanzada pero hoy en día ya se puede observar en personas jóvenes, y ocurre cuando hay una elevada exposición al sol sin protección afectando cabeza y cuello. No obstante se debe dar tratamiento para evitar que el cáncer se propague a otras áreas del cuerpo e incluso afectar a los huesos (ACS, 2017a: pp. 4-5 ).

Carcinoma de células basales



**Figura. 4-1** Cáncer de células basales.

**Fuente.** (Healthwise, 2017: <https://www.healthwise.org/>)

#### *1.4.1.3 Cáncer de células escamosas*

Estas células se encuentran en el estrato córneo, dichas células se trasladan desde la capa basal a la parte más inferior de la epidermis por lo que el cáncer de células escamosas puede ser más agresivo extendiéndose a los tejidos grasos debajo de la piel, ganglios linfáticos y otras partes del cuerpo, de igual manera surge ante la exposición al sol sin protección en la cara, labios, orejas (ACS, 2017b: pp.5).

Carcinoma de células escamosas



© Healthwise, Incorporated

**Figura. 5-1** Cáncer de células escamosas.

**Fuente.** (Healthwise, 2017: <https://www.healthwise.org/>)

#### *1.4.2 Fotoprotección*

La fotoprotección es un cúmulo de normas que permiten acortar los daños cutáneos ocasionados por la exposición solar, es importante poseer una fotoeducación ya que su prioridad es cubrir de la exposición de los rayos UV del sol; sin embargo, aunque la piel tenga mecanismos de defensa y adaptación propios no son suficientes sobre todo en fototipos claros (Gilaberte *et al.*, 2003. pp: 271).

Además es importante conocer que existe dos tipos de fotoprotección entre los cuales se encuentran la fotoprotección intrínseca, donde la piel adopta mecanismos de protección engrosando la epidermis y dermis, la producción de melanina entre otras, esto tendrá una variación según el fototipo cutáneo; por otro lado se encuentra la fotoprotección exógena, esta se basa en disminuir los efectos nocivos a causa de las radiaciones solares mediante líneas de fotoprotección tal como evitar o disminuir la exposición solar, usar ropa y equipo de protección y la aplicación o el consumo de sustancias protectoras (Palacios and Mallo, 2015. pp: 36-41).

Por consiguiente los tipos de fotoprotección ayudan a minimizar o evitar en la mayoría de casos problemas en la salud como es la fotocarcinogénesis y el fotoenvejecimiento, que son los más importantes hoy en día. La fotocarcinogénesis se da a causa de la interacción entre los fotones de la radiación UV y ciertos orgánulos de la célula, donde causa cambios genéticos e inmunodepresión, mientras que el fotoenvejecimiento radica en la apariencia y función de la piel caracterizándose por la aparición de material basófilo en la dermis, a este fenómeno se lo denomina elastosis, todos estos cambios induce a que aumente la producción de metaloproteinasas que conducen rápidamente al fotoenvejecimiento (Gilaberte *et al.*, 2003a. pp: 272-273).

Con el aumento de la conciencia viene un tremendo crecimiento en la industria de la protección solar y la adición de protectores solares a numerosos cosméticos, incluyendo humectantes, lápices labiales y maquillajes base. Sin embargo, sólo una minoría de personas en riesgo usan protectores solares regularmente. En un estudio de 489 caucásicos encuestados en las clínicas de Pennsylvania en el verano de 1982, sólo el 41% utilizó protectores solares, un tercio de los cuales lo hizo en la creencia de que estas pantallas solares en realidad promovían el bronceado (Consalvo *et al.*, 2006: pp. 8-9).

#### ***1.4.3 Fotoprotectores o filtros solares***

Los fotoprotectores son productos que contienen sustancias que impiden la penetración de los RUV en la piel, y que sobre todo deben cumplir con ciertos aspectos como seguridad, estabilidad, eficacia y versatilidad. Existen 4 tipos de fotoprotectores (Montero, 2016: pp.58-66):

- Fotoprotectores químicos u orgánicos.- Son compuestos sintéticos sintetizados a partir del petróleo que intervienen absorbiendo los rayos UVB y muy poco los UVA, actúan captando la energía incidente del sol transformándola en otro tipo de energía que resulte inocua en la piel. Tienen un inconveniente, que pueden causar problemas de salud y fotoalergias.

- Fotoprotectores físicos o inorgánicos.- Son polvos inertes del todo inocuos, fotoestables, de amplio espectro y actúan como barreras reflejando todas las radiaciones solares. Son más utilizados ya que no causan problemas de salud ni fotoalergias.
- Fotoprotectores órgano – minerales.- Pueden actuar por absorción y reflexión incluso pueden actuar en conjunto, se les considera como el futuro para una fotoprotección total ya que también pueden trabajar en conjunto.
- Fotoprotectores biológicos.- Dentro de este grupo se puede encontrar agentes antioxidantes que inhiben la formación de radicales libres potenciando el sistema inmunológico cutáneo, adquiriendo interés de estudio en los últimos años ya que minimizan el estrés oxidativo a causa de los RUV, de tal manera que disminuyen el daño de las células sin interferir en la síntesis de vitamina D.

Los diferentes tipos de fotoprotectores pueden utilizarse de manera tópica donde incluyen las formulaciones cosméticas o medicamentosas, o a su vez de manera oral o sistemática que constituyen una reserva de fotoquímicos como antioxidantes, carotenoides, polifenoles e inmunofotoprotectores (IL-2), pero cabe recordar que no pueden reemplazar la fotoprotección convencional (Gilaberte and González, 2010: pp. 660-661).

#### ***1.4.4 Compuestos fotoquímicos***

##### *1.4.4.1 Radical libre*

Los radicales libres se han estudiado durante mucho tiempo como un contribuyente al envejecimiento y los procesos de enfermedad. La producción endógena de radicales del metabolismo celular y las fuentes exógenas de la radiación ultravioleta y la contaminación pueden dañar la piel en los niveles celulares y tisulares. Aunque el cuerpo posee un elegante sistema de defensa para prevenir el daño de los radicales, este sistema innato puede verse abrumado y conducir a un estado de estrés oxidativo o inmunosupresión, e incluso puede desencadenar la carcinogénesis. La suplementación tópica u oral de antioxidantes puede proporcionar protección adicional para neutralizar especies reactivas de oxígeno de fuentes endógenas y exógenas (Ba, Hu and Wang, 2012: pp. 1013).

#### 1.4.4.2 Antioxidantes

Se han explorado los antioxidantes como un medio para tratar el estrés oxidativo inducido por RUV, y la radiación UVA en particular, su importancia es bloquear parte del daño causado por la exposición al sol. Algunos antioxidantes tópicos y sistémicos incluyen resveratrol, vitamina E, vitamina C, epigallocatequina-3-galato y retinil palmitato (retinoides) entre otros los cuales se pueden conocer con mayor precisión en los extracto de plantas (Matsui *et al.*, 2009: pp.57).

#### 1.4.4.3 Polifenoles

Son sustancias químicas que se encuentran en plantas caracterizándose por contener un grupo fenol, se dividen en taninos y fenilpropanoides y en este grupo se puede encontrar compuestos con efectos fotoprotectores entre los cuales están (Gilaberte and González, 2010: pp. 664-668):

- Flavonoides: Es un pigmento natural que se puede obtener de las sustancias botánicas de la dieta, que ayudan a cuidar de los procesos oxidativos, tienen la capacidad de absorber la RUV.
- Cafeína: La cafeína y el benzoato sódico de cafeína mediante aplicación tópica y gracias a sus efectos fotoprotectores presenta un aumento de la apoptosis inducida por la RUV-B e impide la creación de tumores.
- Chocolate: Las semillas del cacao poseen gran cantidad de polifenoles pero los principales compuestos fotoquímicos fenólicos son la epicatequina, catequina y procianidinas, se debe tener mucho cuidado en el proceso de manufactura ya que afecta a sus compuestos y hace que pierda su valor fotoquímico y nutricional.

### 1.5 Familia de *Malvaceae*

La familia *Malvaceae* está conformada por 243 géneros y un aproximado de 4300 especies, es una familia universal con plantas herbáceas, arbustos que se distribuyen especialmente en Suramérica ubicadas en zonas templadas y cálidas; una característica de esta familia es que presenta nectarios tricómicos (Lattar *et al.*, 2009: pp. 33-34).



**Figura. 6-1** Distribución geográfica de la familia Malvaceae

Fuente: (Lattar *et al.*, 2009: pp. 33-34)

Las más conocidas y de gran importancia económica son el género *Gossypium ssp.* (Algodonero) y en la subfamilia *Sterculioideae* antes denominada *Sterculiaceae* (cacao), por otra parte en Ecuador existe 31 géneros y 105 especies, en los que se incluyen también introducidos y 4 géneros que son nativos entre las que se encuentran arbustos localizados sobre los 2400m.s.n.m. (Botánica, 2016: pp. 211).

### 1.6 *Theobroma cacao*



**Figura. 7-1** *Theobroma cacao*

Fuente: (Cacao, 2018: <http://www.observatoriodelcacao.com>)

El *Theobroma cacao* fue denominado así por Carl von Linné en 1753, se localiza en bosques tropicales lluviosos que se distribuyen naturalmente desde la cuenca del Amazonas por el sur hasta la zona de América Central, su gran mayoría se encuentra en la región amazónica como el Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia. Se lo consideraba por su significado en griego el “alimento de los dioses”, y en la época precolombina se le utilizó como moneda de cambio (Cacao, 2018: <http://www.observatoriodelcacao.com>).

### 1.6.1 Clasificación taxonómica

**Tabla 2.1:** Taxonomía de *Theobroma cacao*

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Dicotyledonae
<b>Orden:</b>	<i>Malvales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Malvaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Theobroma</i>
<b>Especie:</b>	<i>T. cacao</i>
<b>Epítelo específico:</b>	<i>Theobroma cacao</i>

Fuente:(Mazariegos, 2009: pp. 10)

Realizado por: Johanna Romero, 2018

### 1.6.2 Descripción botánica

Es una especie arbórea que requiere de una humedad de 1150-2500 mm, temperaturas de 21-32°C y una altitud no más de 700 m.s.n.m., pueden llegar a medir de 4 a 8 metros de altura y pudiendo alcanzar los 20 metros, las hojas son grandes, simples, enteras verdes oscuras, la flor es muy delicada con péndulos de 20 a 30 cm y el fruto es una baya larga que mide de 15 a 25 cm y contiene de 30 a 40 semillas de color rojo-parduzco (Beckett, 2016: pp. 3-5).

### 1.6.3 Componentes importantes

Las semillas de cacao tiene más de 300 compuestos pero muchos de ellos son termolábiles, volátiles como los esteres, hidrocarbólatonas, monocarbonilos, piroles (Kalvathev, Garzaro and Guerra, 2008: pp. 23). Los que destacan e importantes son los esteres alifáticos, su alta concentración en polifenoles, carbonilos aromáticos insaturados y taninos, además de su gran cantidad de antioxidantes con estructura de las catequinas y epicatequinas aparte de ácidos grasos (Buenaventura and Gutiérrez, 2002: pp. 149).

### 1.6.4 Usos

**Tabla 3.1:** Usos de *Theobroma cacao*

<b>Alimenticio</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Pasta o licor de cacao, polvo de cacao, manteca de cacao y como primordial el chocolate.</li><li>✓ Los indígenas mesoamericanos combinaron las semilla con o sin azúcar junto con las semillas del porchote para elaborar la bebida</li></ul>
--------------------	---

	<p>llamada “chocollatl”</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ La pulpa utilizaban como comida y para fabricar brebajes.</li> <li>✓ Bebida ceremonial.</li> </ul>
<b>Rituales</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Según los mayas y mexicas tiene un origen divino, por lo que fueron estelas mayas.</li> <li>✓ Representaba una poderosa divinidad en la cosmología, ejemplo el Dios <i>Ek Chuah</i> quien era el encargado del cacao.</li> <li>✓ Los granos de cacao acompañaban hasta la muerte a los mayas, como ofrenda.</li> <li>✓ El ritual de los Bacabs (<i>Princeton Codex</i>) contienen un sin número de hechizos para tratar ciertos problemas de salud, donde se le administra al paciente un plato con cacao, pimientos, miel y jugo de tabaco.</li> </ul>
<b>Compra</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ En siglo XIX se utilizaba las semillas del cacao para la compra de esclavos, objetos de lujo, de limosna para los mendigos y como tributo hacia la realeza prehispánica.</li> </ul>
<b>Medicinal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Se utilizaba como energizante, tónico.</li> <li>✓ Vehículo para otros medicamentos</li> <li>✓ Aumentar la resistencia física.</li> <li>✓ Reducir la fatiga</li> <li>✓ Estimular el apetito</li> <li>✓ Afrodisíaco</li> <li>✓ Brebajes para dolores estomacales e intestinales</li> <li>✓ En conjunto con la corteza del árbol de algodón de seda se trataban infecciones.</li> <li>✓ Para aliviar la fiebre, respiración jadeante y el corazón débil pero mezclando con maíz y con una hierba llamada <i>tlacoxóchitl</i> o <i>Calliandra anomala</i>.</li> <li>✓ Para curar la fatiga se utilizaba las flores pero para bañarse.</li> <li>✓ La manteca de cacao se usa como lubricante de piel, en los labios agrietados, emoliente para la bronquitis y catarro crónico.</li> <li>✓ Estimula el sistema nervioso.</li> <li>✓ Mejora la digestión y el tránsito intestinal, molifica las heces por lo que puede reducir o curar las hemorroides.</li> <li>✓ Diurético y vasodilatador</li> <li>✓ Para la elaboración de ungüentos, pomadas.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ De manera tópica se usa en las mordidas de serpientes.</li> <li>✓ Actividad antitumoral en la raíz y corteza.</li> </ul>
<b>Industria farmacéutica y Cosmética</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Sirve para fabricar cosméticos y perfumes.</li> </ul>

Fuente:(Waizel-Haiat *et al.*, 2012: pp. 238-239)

Realizado por: Johanna Romero, 2018.

### ***1.6.5 Actividades biológicas comprobadas***

Según (Ochoa, 2016: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>) se ha comprobado en ratas aplicando una dieta de 1.22% de semillas del cacao por 3 meses y presentó un efecto estimulante en la producción de glóbulos rojos, mientras que el aceite de las semillas aplicado vía subcutánea en ratones hembras un efecto estrogénico y por último los extractos acuosos de la corteza y semillas del cacao presentan antiviral contra el virus herpes tipo 2.

De igual manera (Cuéllar and Guerrero, 2012: pp. 3181-3182) realizo estudios de actividad antibacteriana in vitro de la cascara de *Theobroma cacao*, por lo que se observó que la fracción clorofórmica frente a *Bacillus cereus* ATCC 11778 y *Streptococcus agalactiae* (autóctona) con un resultado inhibitorio del 34.90% (100 µg/µl) y 52.40% (100 µg/µl), y con una concentración mínima inhibitoria de 512 µg/ml frente a estas dos bacterias.

Y hoy en día está a la vanguardia investigaciones sobre la fotoprotección, que por sus compuestos bioactivos y antioxidantes ayudan a la fotoprotección endógena evitando muchas enfermedades oxidativas como el envejecimiento causado por la exposición solar (Scapagnini, 2017: <http://agroalimentando.com>).

## CAPITULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1 Lugar de investigación

La investigación se realizó en los Laboratorios de Productos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia.

#### 2.2 Recolección del material vegetal

El material vegetal fue recolectado en marzo 2018, en el cantón Caluma, provincia de Bolívar, a 1478 m.s.n.m.

Las coordenadas geográficas fueron:

- ✓ Latitud: 12°36'19" S
- ✓ Longitud: 79°18'22" O

#### 2.3 Identificación del Material Vegetal

La muestra vegetal recolectada fue analizada e identificada en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato campus Queracocha, por el Ing. Pedro Pablo Pomboza Tamaquiza PhD coordinador de investigación de dicha facultad.

#### 2.4 Material vegetal

Se trabajó con el extracto alcohólico de semilla de *Theobroma cacao*.

#### 2.5 Equipos y reactivos

##### 2.5.1 Equipos

**Tabla 1.2.** Equipos utilizados para el ensayo fotoprotector

Proceso	Equipos
Molienda y secado de la planta	❖ Estufa (Marca Memmert) ❖ Molino (Marca Thomas Co)
Tamizaje fitoquímico	❖ Sonicador (Marca Branson 2510) ❖ Balanza (Marca Radwag)
Control de calidad	❖ Desecador

	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Estufa (Marca Memmert)</li> <li>❖ Mufla (IVYMEN N-8LITROS 1100°C)</li> <li>❖ Sonicador (Marca Branson 2510)</li> <li>❖ pHmetro (Marca SPER SCIENTIFIC)</li> <li>❖ Picnómetro</li> <li>❖ Refractómetro</li> </ul>
<b>Obtención del extracto alcohólico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Rotavapor (Marca BUCHI 461 Water Bath)</li> <li>❖ Congelador (Marca GE Prolife)</li> </ul>
<b>Ensayo fotoprotector y Elaboración del fotoprotector</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>❖ Espectrofotómetro (Marca Cole-Palmer)</li> <li>❖ Tubos de ensayo</li> <li>❖ Vasos de precipitación</li> <li>❖ Pipetas</li> <li>❖ Balones de aforo</li> <li>❖ Varilla de agitación</li> <li>❖ Olla para baño maría</li> <li>❖ Reverbero</li> <li>❖ Envases estériles</li> </ul>

Elaborado por: Johanna Romero, 2018.

### 2.5.2 Reactivos

**Tabla 2-2.** Reactivos utilizados para el desarrollo de los ensayos

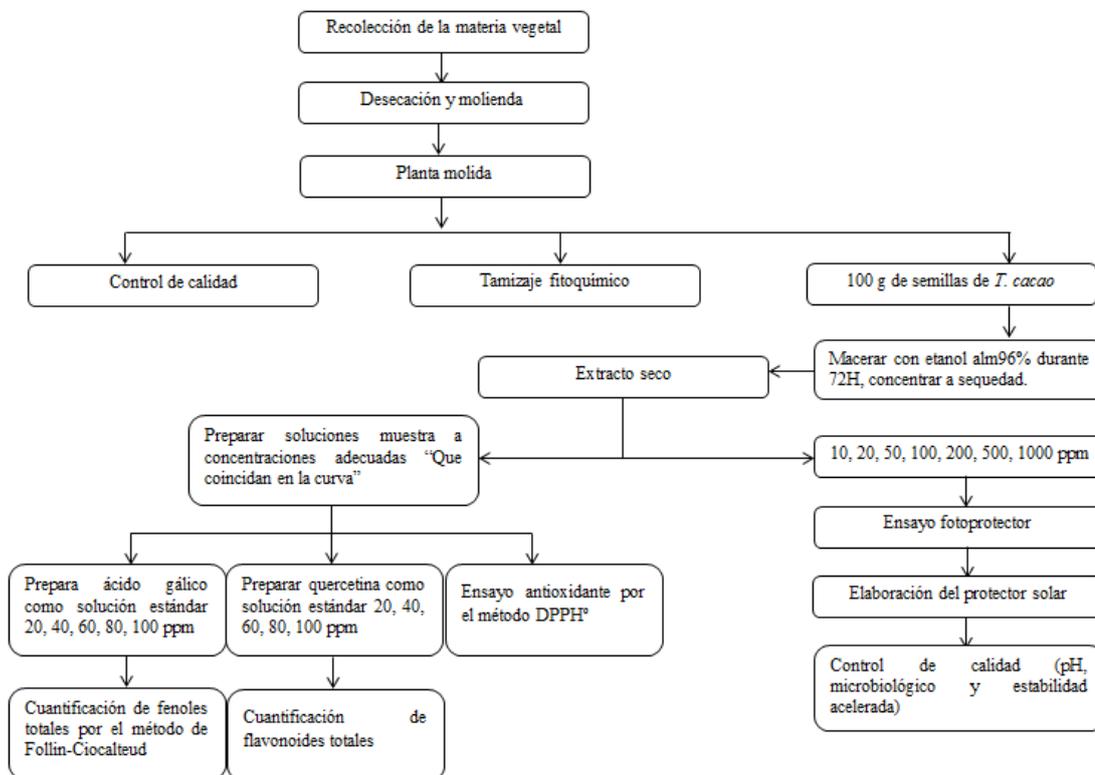
<b>Procesos</b>	<b>Reactivos</b>
<b>Tamizaje fitoquímico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Agua destilada</li> <li>➤ Ácido clorhídrico</li> <li>➤ Cloruro de sodio</li> <li>➤ Reactivo de Drangendorff</li> <li>➤ Reactivo de Mayer</li> <li>➤ Reactivo de Wagner</li> <li>➤ Alcohol</li> <li>➤ Reactivo de Baljet</li> <li>➤ Cloroformo</li> <li>➤ Hidróxido de sodio 5%</li> <li>➤ Anhídrido acético</li> <li>➤ Ácido sulfúrico</li> <li>➤ Fehling A</li> <li>➤ Fehling B</li> <li>➤ Tricloruro férrico 5%</li> <li>➤ Cloruro de sodio 0,9 %</li> <li>➤ Magnesio metálico</li> <li>➤ Alcohol amílico</li> <li>➤ Éter-Etanol</li> </ul>
<b>Control de calidad</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ácido clorhídrico 10%</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ácido nítrico</li> <li>➤ Peróxido de hidrogeno</li> <li>➤ Nitrato de amonio 10%</li> </ul>
<b>Ensayo fotoprotector</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Extracto alcohólico</li> </ul>
<b>Elaboración del fotoprotector</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ester de azúcar</li> <li>➤ Aceite de aguacate</li> <li>➤ Aceite de oliva</li> <li>➤ Aceite de almendras</li> <li>➤ Manteca de cacao</li> <li>➤ Manteca de coco</li> <li>➤ Vitamina E</li> <li>➤ Conservantes</li> <li>➤ Chocolate</li> <li>➤ Extracto de cacao</li> </ul>

Realizado por: Johanna Romero, 2018

## 2.6 Técnicas y métodos

La metodología que se empleó para realizar el control de calidad, tamizaje fitoquímico, cuantificación de fenoles totales, cuantificación de flavonoides totales, antioxidante ensayo fotoprotector y elaboración del fotoprotector se menciona en la figura 1-2.



**Figura 1-2.** Protocolo de investigación

Realizado por: Johanna Romero, 2018.

## ***2.6.1 Secado y molienda de la materia vegetal***

### ***2.6.1.1 Secado***

Las semillas de *Theobroma cacao* fueron seleccionadas, lavadas y secadas a una temperatura de 50° C en una estufa de aire caliente.



**Fotografía 1-2.** Secado de las semillas

**Realizado por:** Johanna Romero, 2018

### ***2.6.1.2 Molienda***

Para el proceso de trituración de la materia vegetal se utilizó un mortero, para evitar perder compuestos y que por su alto contenido en grasa impedir que se adhiriera a las paredes del molino, se obtuvo trazas de 2 a 3 mm de espesor, con los cuales se procedió a realizar los ensayos de control de calidad, tamizaje fitoquímico, cuantificación de fenoles totales, cuantificación de flavonoides totales, antioxidante, ensayo fotoprotector y elaboración de fotoprotector.

## ***2.6.2 Control de calidad***

### ***2.6.2.1 Determinación de cenizas totales***

Se pesó 2g de muestra vegetal en un crisol previamente tarado, se calcinó en un reverbero hasta carbonización, posterior se incineró en una mufla a 700°C durante 2 horas, se dejó enfriar el crisol en un desecador y nuevamente se pesó (Se repite el procedimiento hasta obtener un masa constante).(Miranda, 2006a: p.27)

Cálculo:

$$\%C = \left[ \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \right] * 100$$

En donde:

%C = contenido de cenizas en porcentaje de masa

m = masa del crisol vacío en g

m<sub>1</sub> = masa del crisol con la muestra después de la incineración en g

m<sub>2</sub> = masa del crisol con la muestra antes de la incineración en g



**Fotografía 2-2.** Cenizas totales

Realizado por: Johanna Romero, 2018

#### 2.6.2.2 Determinación de cenizas solubles en *agua*

A las cenizas obtenidas de las cenizas totales, se le añadió 15 mL de agua destilada y se calienta a una temperatura de 60°C durante 5 min. Posteriormente, la muestra se filtró y carbonizó en un reverbero para proceder a incinerar en la mufla a una temperatura de 700°C durante 2h. (Se repite el procedimiento hasta obtener una masa constante). (Miranda, 2006b: p.27)

Cálculo:

$$\%Ca = \left[ \frac{m_1 - m_a}{m_2 - m} \right] * 100$$

En donde:

%Ca = Porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada

m = masa del crisol vacío en g

m<sub>a</sub> = masa del crisol con la ceniza insoluble en agua en g

m<sub>1</sub> = masa del crisol con la muestra en g

m<sub>2</sub> = masa del crisol con la ceniza total en g

### 2.6.2.3 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

Las cenizas obtenidas de las cenizas totales se colocó en un crisol, al cual se añadió 2 mL de ácido clorhídrico al 10%, se cubre el crisol con un vidrio reloj y se procede a calentar durante 10 min en un reverbero. Se lavó el material de vidrio con 5 mL de agua caliente para retirar los residuos depositados en las paredes, el contenido se mezcló a la muestra del crisol. Se filtra el contenido del crisol, se lavó el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico (se añadió 2 gotas de nitrato de plata 0,1 mol/L) no presente cloruros. El filtrado con el residuo se deseca a 105°C y se trasladó al crisol inicial para ser incinerado en una mufla a 700 ° C durante 2 h. Finalmente se traspasó a un desecador hasta que se enfríe (Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante). (Miranda, 2006c: p.28)

Cálculo:

$$\%B = \left[ \frac{m_2 - m_1}{m} \right] * 100$$

En donde:

B = Porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

m = muestra utilizada en g

m<sub>1</sub> = masa del crisol con la muestra en g

m<sub>2</sub> = masa del crisol con la ceniza insoluble en ácido clorhídrico en g

### 2.6.2.4 Determinación del contenido de humedad (Método gravimétrico)

Se pesó 2 g de muestra molida en una cápsula de porcelana previamente tarada a 105 °C (hasta masa constante). Posteriormente se desecó durante 3 h, se dejó enfriar la cápsula con la muestra en el desecador y se pesó. Se colocó nuevamente la cápsula en la estufa durante 1h, se retiró para ser pesado. (Se repite el procedimiento hasta mantener una masa constante). (Miranda, 2006d: p.28)

Cálculo

$$\%SS = \left[ \frac{m_2 - m_1}{m_2 - m} \right] * 100$$

En donde:

SS= sustancia seca en porcentaje en masa.

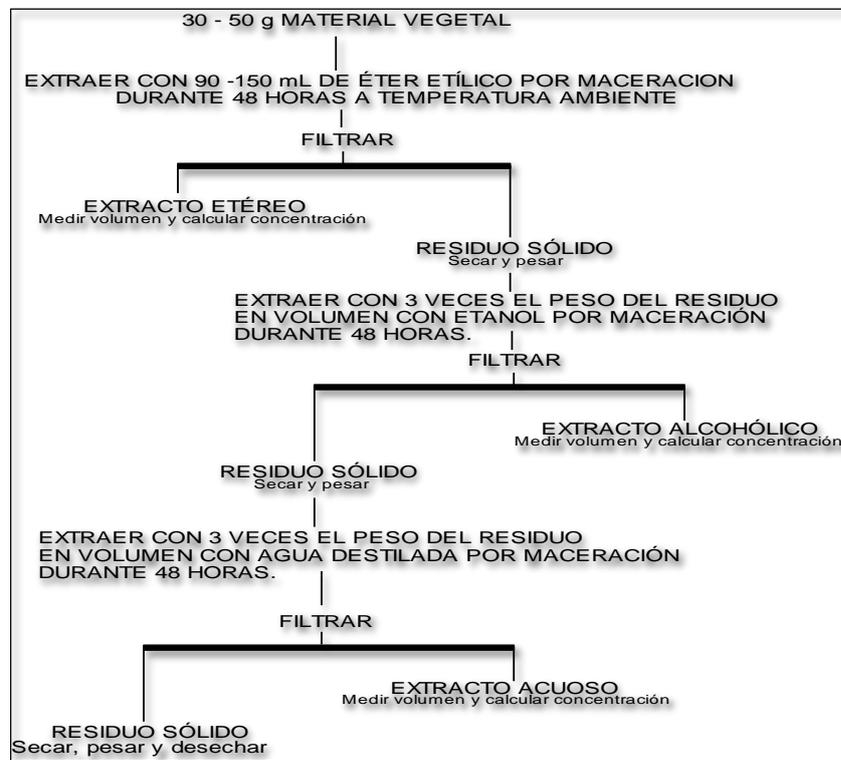
m = masa de la cápsula vacía en g

m<sub>1</sub>= masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada en g

m<sub>2</sub>= masa de la cápsula con la muestra en g

### 2.6.3 Tamizaje fitoquímico

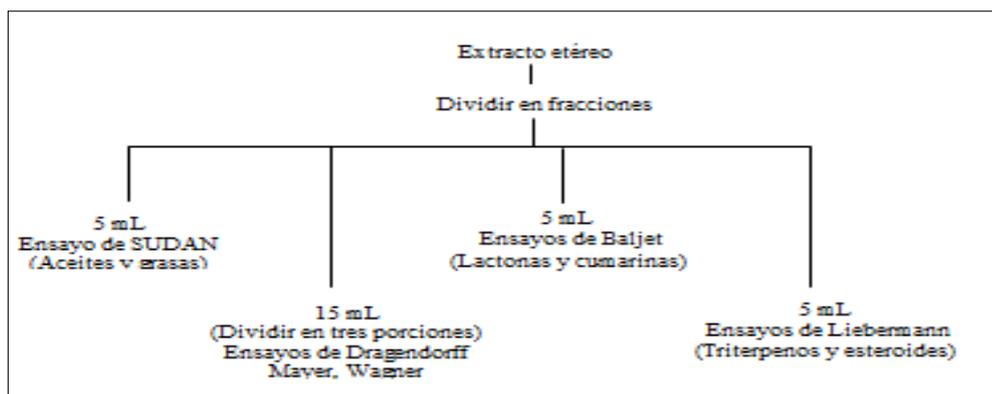
Consiste en una serie de pruebas para determinar de manera cualitativa los principales grupos químicos presentes en las plantas. El proceso se basa en la maceración con solventes de polaridad creciente para garantizar la máxima extracción de los compuestos.



**Figura 2-2.** Protocolo de obtención de extractos

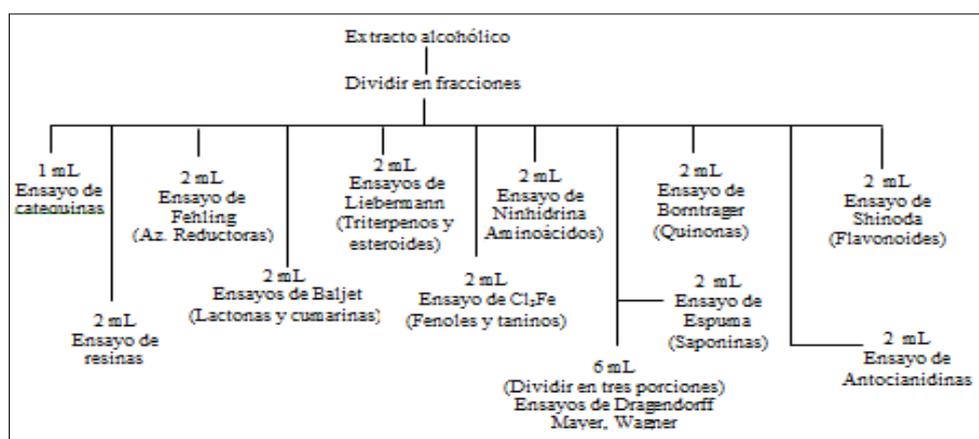
Fuente: (Miranda, 2006e: p.32)

Con los extractos obtenidos (Figura 5-2) se realizó ensayos y pruebas para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en las semillas, basándose en la observación de los cambios de color y formación de precipitados. Las reacciones llevadas a cabo en cada uno de los extractos se exponen a continuación.



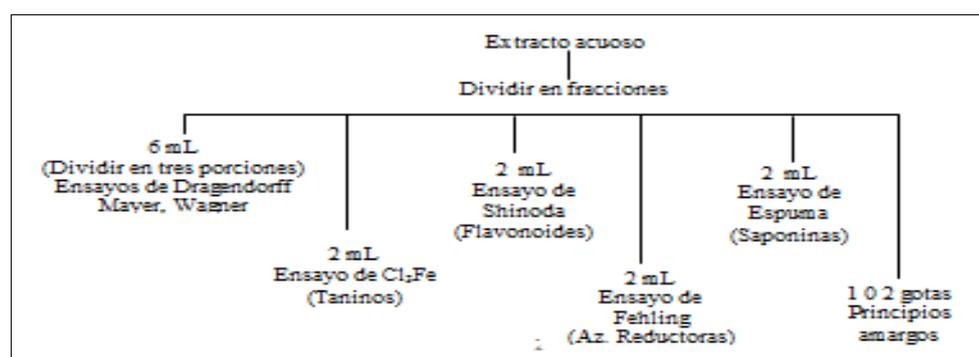
**Figura 3-2** Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.

Fuente: (Miranda, 2006f: pp.34-37)



**Figura 4-2** Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda, 2006g: pp.34-37)



**Figura 5-2** Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.

Fuente: (Miranda, 2006h: pp.34-37)

#### **2.6.4 Obtención del extracto alcohólico**

Para la obtención del extracto alcohólico se pesó y se colocó 100 g de semilla con 1000 mL de etanol al 96%, se deja macerar durante 72 h en un envase de color ámbar, posteriormente el contenido se sónica durante 1h y se filtra el contenido.



**Fotografía 3-2** Extracto alcohólico

**Realizado por:** Johanna Romero, 2018

El filtrado fue utilizado para la determinación de los parámetros de calidad como se detallan a continuación:

##### **2.6.4.1 Determinación de los requisitos organolépticos**

Se determinó el aspecto, color, olor y sabor del extracto.

- ❖ **Determinación de olor:** Se tomó una tira de papel y se introduce en el extracto, se percibe el olor para determinar si pertenece a las características propias del extracto obtenido. (Miranda, 2006g: p.27)
  
- ❖ **Determinación de color:** En un tubo de ensayo completamente seco y limpio se trasvasa la muestra de ensayo (extracto de semillas), hasta las  $\frac{3}{4}$  partes y se observa el color, la transparencia y si es el caso la separación de capas. (Miranda, 2006h: p.27)

##### **2.6.4.2 Determinación de densidad relativa**

Se pesa un picnómetro vacío y seco, posteriormente se llena el picnómetro con el extracto y se introduce en una estufa a 25°C durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se deja enfriar y se pesa cuidadosamente el picnómetro con la muestra. (Miranda, 2006i: p.37)

Se repitió el mismo procedimiento usando agua destilada.

Cálculo:

$$\%D_{25} = \left[ \frac{m_1 - m}{m_2 - m} \right] * 100$$

En donde:

$D_{25}$ = Densidad relativa

$m$  = masa del picnómetro vacío en g

$m_1$ = masa del picnómetro con la muestra en g

$m_2$ = masa del picnómetro con el agua en g

#### 2.6.4.3 Determinación del índice de refracción

Se coloca una gota de la muestra de análisis sobre el prisma de medición, se enfoca la luz moviendo el compensador cromático hasta lograr obtener la intersección entre los campos claro y oscuro. (Miranda, 2006j: p.37)

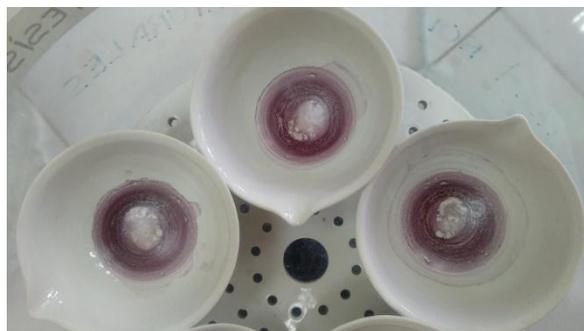
#### 2.6.4.4 Determinación del pH

Se ajusta el pHmetro con las soluciones buffer reguladoras y se procede a medir el pH.

Sobre la muestra a analizar se introdujo el pHmetro.

#### 2.6.4.5 Determinación de sólidos totales

En una cápsula de porcelana previamente tarada, se añade 5 mL del extracto alcohólico, se evapora el contenido de la capsula en baño de agua hasta que el residuo este aparentemente seco. Se pasa a una estufa hasta que alcance un peso constante (Miranda, 2006k: p.38).



**Fotografía 4-2.** Sólidos totales.

Realizado por: Johanna Romero, 2018.

Cálculo:

$$\%St = \left[ \frac{Pr - P}{V} \right]$$

En donde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo en g

P = masa de la cápsula vacía en g

V = volumen de la porción de ensayo en mL.

### ***2.6.5 Obtención del extracto seco del Theobroma cacao***

El filtrado anterior se transfirió a un balón esmerilado de 250 mL, y se procedió a concentrar en el rotavapor BÜCHI 461 a 50°C y a presión reducida, se evaporó en su totalidad y luego se congeló el concentrado.

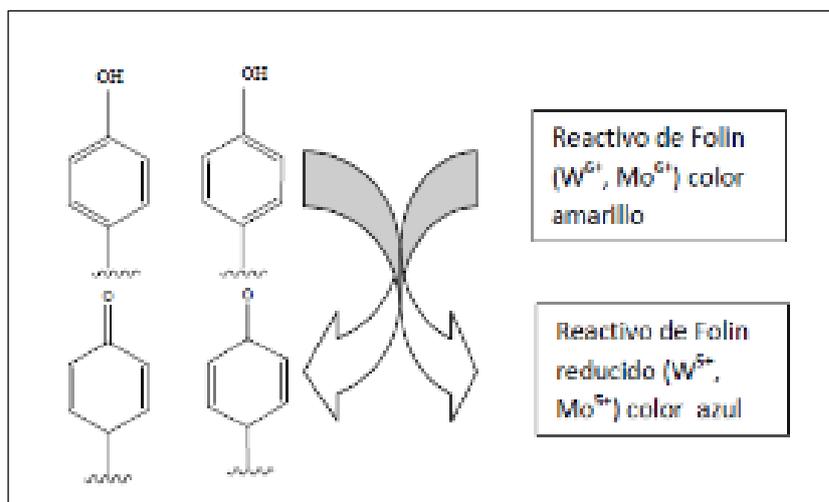


**Fotografía 5-2** Extracto seco

Realizado por: Johanna Romero, 2018

### ***2.6.6 Cuantificación de fenoles totales***

La cuantificación de fenoles totales es una técnica basada en el método de Folin-Ciocalteu, se fundamenta en una reacción redox, donde los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu de color amarillo que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es medida a 765 nm. (Alhakmani et al., 2013a: p.625)



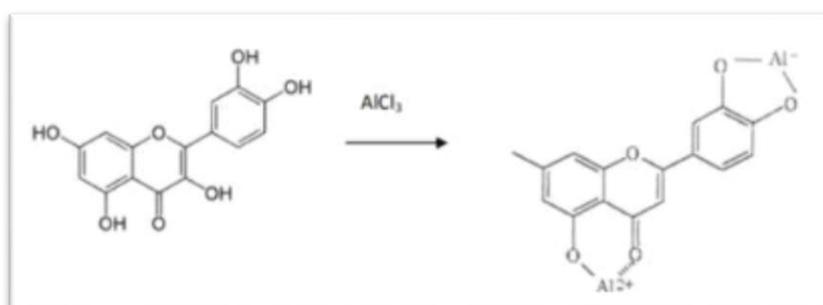
**Figura 6-2.** Fundamento de la reacción de Folin Ciocalteu

Fuente: (Alhakmani et al., 2013b: p.625)

Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico por cada 100 g de extracto liofilizado.

### 2.6.7 Cuantificación de flavonoides totales

El catión de aluminio forma complejos estables con flavonoides en etanol, que se producen en el análisis espectrofotométrico un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores y una intensificación de la absorción. Así, es posible determinar la cantidad de flavonoides, evitando la interferencia de otras sustancias fenólicas, especialmente ácidos fenólicos, que invariablemente acompañan a los flavonoides en los tejidos vegetales (Amaya & Portillo 2013a, p.53).



**Figura 7-2.** Fundamento de la reacción de Tricloruro de Aluminio

Fuente: (Amaya & Portillo 2013a, p.53)

Se preparó como solución estándar quercetina a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm en metanol, para la realización de la curva de calibración. Posteriormente se preparó las soluciones problema (extracto liofilizado de Hojas) a una concentración de 100 ppm en etanol al 70%, y se midió la absorbancia a 510nm.

### 2.6.8 Ensayo antioxidante por el método DPPH<sup>•</sup>

Para evaluar la actividad antioxidante de compuestos o extractos específicos, estos últimos pueden reaccionar con un radical estable, 2,2-difenilpicrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) en una solución de metanol. La reducción de DPPH<sup>•</sup> se controla por la disminución de su absorbancia a una longitud de onda característica durante la reacción. En su forma radical, DPPH<sup>•</sup> absorbe a 515 nm, pero tras la reducción por un antioxidante (AH) o una especie radical (Re), la absorción desaparece (Cuvelier & Berset 1995a: pp.28).

Se prepararon soluciones de muestra a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 ppm para semillas, (el diluyente fue etanol al 96%); 7 mg de DPPH<sup>•</sup> se diluyeron en un volumen de 250 mL con metanol. La absorbancia de esta solución debía oscilar entre 0,6 a 0,8 por lo que se esperó hasta que se estabilice y alcance la absorbancia adecuada para la realización de ensayo (Cuvelier & Berset, 1995b: pp.28).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Absorbancia del control positivo (DPPH}^\bullet) - \text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia del control positivo (DPPH}^\bullet)} \times 100$$

### 2.6.9 Determinación del factor de protección solar (FPS)

La determinación del factor de protección solar (FPS) de las semillas de *Theobroma cacao* se realizó a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm, el blanco fue etanol al 96%. Se realizó un análisis espectrofotométrico a diferentes longitudes de onda englobadas entre 290-320 nm, con intervalos de 5 nm; se utilizó el espectrofotómetro UV Cole Parmer S-21590 y celdas de cuarzo de 1 cm (Goncalves, et al., 2013, pp. 122-127).

El cálculo del FPS del extracto se determinó mediante la ecuación de Mansur.

$$\text{FPS} = \text{CF} \times \sum_{290}^{320} \text{EE}(\lambda) \times \text{I}(\lambda) \times \text{Abs}(\lambda)$$

Dónde:

EE ( $\lambda$ ) Representa el espectro del efecto eritemal

I ( $\lambda$ ) Representa la intensidad del espectro solar

Abs ( $\lambda$ ) Representa la absorbancia del producto con protección solar

CF es el factor de corrección igual a 10

Los valores de la relación entre el efecto eritemal y la intensidad de la radiación para cada longitud de onda  $EE(\lambda) \times I(\lambda)$  son constantes como se indica a continuación.

**Table 2:** Normalized product function used in the calculation of SPF.

Wavelength (nm)	EE x I (normalized)
290	0.0150
295	0.0817
300	0.2874
305	0.3278
310	0.1864
315	0.0839
320	0.0180
<b>Total</b>	<b>1.0000</b>

EE – erythema effect spectrum; I – Solar intensity spectrum.

**Figura. 8-2** Valores de EE x I preestablecidos

Fuente: (Goncalves, et al., 2013, pp. 122-127).

### 2.6.10 Determinación de las cantidades de los excipientes para formular el protector solar.

Se determinó las cantidades y tipos de excipientes para formular el protector solar con base del extracto de *T. cacao* para 60mL.

**Tabla 3. 2** Excipientes para las formulaciones de la crema protectora al 100%

EXCIPIENTES	FOMULACIÓN			FDA (%)	PROPIEDADES
	1	2	3		
<b>FASE OLEOSA</b>					
Ácido esteárico	13.2	13.2	13.2	22	Coemulgente
Alcohol cetílico	3.6	3.6	3.6	6	Oclusivo
Aceite de aguacate	-	16.2	16.2	27	Emoliente y lubricante
Aceite de oliva	-	16.2	16.2	27	Emoliente y lubricante
Aceite de almendras	-	16.2	16.2	27	Emoliente y lubricante
Manteca de coco	3.5	-	3.5	N/A	Emoliente y lubricante
Manteca de cacao	3.5	-	3.5	N/A	Emoliente
Chocolate (filtrado)	8	8	8	N/A	Colorante
Óxido de zinc	7.2	7.2	7.2	12	Protector solar
Vitamina E	0.0012	0.0012	0.0012	0.002	Antioxidante
<b>FASE ACUOSA</b>					
Glicerina	2.4	-	2.4	4	Humectante
Estearato de sacarosa	4.2	4.2	4.2	7	Tensioactivo

Parabenos	0.09	0.09	0.09	0.15	Conservante
Extracto de <i>T. cacao</i> c.s.p	60 g	60 g	60 g		Fotoprotector y antioxidante

Fuente: FDA, 2018

Realizado por: Johanna Romero, 2018; N/A: no aplica

### ***2.6.11 Método de elaboración del protector solar***

1. Disolver los componentes lipófilos a 60°C
2. Disolver los componentes hidrófilos con el extracto de *T. cacao* y llevar a 60°C
3. Agregar la fase oleosa en la fase acuosa con agitación
4. Agitar hasta que llegue a temperatura ambiente.
5. Envasar

### ***2.6.12 Control de calidad del producto terminado***

El control de calidad de un producto terminado se hace con el fin de verificar si una forma farmacéutica cumple con los atributos de calidad establecidos.

#### ***2.6.12.1 Descripción organoléptica***

A las cremas se registró las características organolépticas como son el aspecto, color, olor y en algunos casos el sabor.

#### ***2.6.12.2 Controles fisicoquímicos***

- Determinación de grumos.- Se tomó una pequeña cantidad de crema entre los dedos, se aplica en el dorso de la mano observando si existe la presencia de grumos.
- Determinación del pH.- Se disolvió 1g de crema en 10mL de agua destilada y se procede a medir el pH.
- Determinación de la extensibilidad.- Se pesó 1g de crema sobre el centro una placa de vidrio de 20x20cm colocando por debajo papel milimetrado para medir la dispersión de la crema, se cubre con otra placa de vidrio del mismo tamaño y se coloca un peso de 200g por 2 minutos, la crema no debe extenderse más de 7cm.
- Tipo de emulsión.
  - Prueba de disolución.- Se dispersó 0.5g de crema en 50mL de agua. Cuando es una emulsión aceite/agua (O/W) se forma una emulsión lechosa.

- Prueba de lavado.- Se colocó 1g de crema sobre la superficie seca de la mano, se aplica debajo del grifo de agua con ayuda del dedo índice, si se puede lavar fácilmente es una emulsión agua en aceite (W/O).

#### *2.6.12.3 Control microbiológico*

- TEST PARA EL CONTAJE TOTAL DE AERÓBIOS

Se transfirió 1 g de muestra en 9mL de agua peptonada, si se requiere se sumerge en baño María a una temperatura de 40 - 45°C por 10 minutos. Seguido se procede a sembrar 30μL de la muestra en cajas Petri con PCA, y se deja incubar a 30 - 35°C de 48 a 120 horas.

- TEST PARA HONGOS

De la muestra de agua peptonada, se obtiene 30μL para sembrar en agar Sabouraud y se incubó de 20 - 25°C por 5 – 7 días.

Cuando culminó el tiempo de crecimiento se cuenta el número de colonias, reportando el total de aerobios u hongos por gramo o mL de muestra.

#### *2.6.12.4 Control de estabilidad*

Se realizó una pre-estabilidad por un tiempo de 30 días, sometiendo a los envases contenidos de la crema protectora a una temperatura de 40°C y un promedio de 75% de humedad. Se observó constantemente las condiciones del sistema y un muestreo cada 7 días para sus respectivas pruebas de control.

## CAPITULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

#### 3.1 Control de calidad de la droga cruda de granos *Theobroma cacao*

En la tabla 1-3 se expresan los resultados del control de calidad de los granos de *Theobroma cacao*.

**Tabla 1-3.** Resultados de parámetros de calidad

Parámetro	Granos de <i>Theobroma cacao</i> (%)	Especificaciones USP #35
Humedad	2.09±0.060	Hasta 14%
Cenizas totales	3.61±0.086	Hasta 12%
Cenizas solubles en agua	2.08±0.010	Hasta 7%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	1,53±0.088	Hasta 5%

Realizado por: Johanna Romero, 2018. Los valores es el promedio de  $\pm$  DS, n=3.

En la tabla 1-3, se puede observar que el contenido de humedad de los granos de *T. cacao* fue de 2.09% dicho valor se encuentra en los límites permitidos según la UPS#35, lo que demuestra que inhibe procesos de degradación mediante enzimas y el crecimiento de microorganismos, lo que garantiza la estabilidad y calidad del objeto de investigación protegiendo su acción cosmeceútica. Sin embargo Álvarez *et al.* (2010: pp. 82-84) corrobora que al ser sometidos los granos de cacao a un proceso de secado, la humedad disminuye entre un 6-8% este valor refleja que al dar manipulación de los mismo se torna quebradizos al tacto, mientras que si el valor de la humedad aumenta tiende a elevar la producción de malos olores y la proliferación de hongos afectando su valor y calidad del producto.

El resultado de cenizas totales indica el contenido de fosfatos, carbonatos entre otros minerales; cenizas solubles en agua indica la contaminación con metales pesados y cenizas insolubles en ácido clorhídrico indica el contenido de salicilatos que la planta pudo absorber donde se encuentre plantada (WHO. 1998, pp. 29).

Por lo tanto los datos obtenidos de cenizas totales 3.61%, cenizas solubles en agua 2.08% y cenizas insolubles en ácido clorhídrico 1.53%. Los valores se encuentran dentro del rango respectivo según la USP#35.

### 3.2 Análisis cualitativo

#### 3.2.1 Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico de los granos crudos de *T. cacao*, se realizó en base a lo señalado en las Normas Ramales (Cuba) de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006, pp. 3864), donde se empleó distintos solventes como: hexano, etanol y agua. Los resultados obtenidos se expresan en la siguiente tabla:

**Tabla 2-3.** Resultados del tamizaje fitoquímico de granos de *Theobroma cacao*

Ensayo a realizar	Compuesto a identificar	Extracto hexánico	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Dragendorff	Alcaloides	(+)	(+)	(+)
Mayer	Alcaloides	(+)	(+)	(+)
Wagner	Alcaloides	(+)	(+)	(+)
Sudan	Compuestos grasos	(+++)	N/A	N/A
Baljet	Lactonas (Cumarinas)	(-)	(-)	N/A
Liebermand – Buchard	Triterpenos y/o esteroides	(+)Verde oscuro negro final	(+)Verde oscuro negro final	N/A
Catequinas	Catequinas	N/A	(+)	N/A
Resinas	Resinas	N/A	(-)	N/A
Fehling	Azúcares reductoras	N/A	(+)	(+)
Espumas	Saponinas	N/A	(-)	(-)
Tricloruro férrico	Fenoles y taninos	N/A	(+++)color azul	(+++)color azul
Borntrager	Quinonas	N/A	(+)	N/A
Shinoda	Flavonoides	N/A	(++)color rojo	(++) color rojo
Antocianinas	Flavonoides	N/A	(+)	N/A
Mucilagos	Polisacáridos	N/A	N/A	(-) Gelatinoso
Principios amargos	Principios amargos y astringentes	N/A	N/A	(+) Ligeramente astringente

(N/A) No aplica, (-) Ausencia, (+) Escaso, (++) Mediadamente abundante, (+++) Abundante

**Realizado por:** Johanna Romero, 2018

El ensayo de Sudán dio positivo en el extracto hexánico de *T. cacao* lo que permite evidenciar la presencia de compuestos grasos, donde según Morales, García and Méndez, (2012: pp. 80) su contenido en grasa en alto aproximadamente en un 55% del cual un 35% son ácidos grasos insaturados como el oleico.

Los ensayos de Dragendorff, Wagner y Mayer en los tres extractos permitió identificar alcaloides y según Vázquez-Ovando *et al.*, (2016: p. 240) los alcaloides son el contenido de un 4% en los granos de *T. cacao* que son los responsables del amargor y la palatabilidad, y otros no pueden ser analizados con mayor precisión debido al encubrimiento de las grasas.

El ensayo de catequinas da la presencia de un subgrupo de flavonoides, los flavan-3-ol, que comparando con Vázquez-Ovando *et al.*, (2016: p. 244) dice que el 37% protagonizan el total del *T. cacao*. Es decir que el extracto alcohólico de *T. cacao* contiene compuesto de tipo epicatequina que es la única molécula que en un 98% arma el grupo, mientras que las proantocianidinas son el principal componente con un 58% presente y característico en los granos de cacao.

El ensayo de Fehling ratificó la presencia de azúcares reductores en los extractos de los granos de *Theobroma cacao* comprobando con el resultado de Vázquez-Ovando *et al.*, (2016: p. 244) donde dice que los azúcares ligados a los polifenoles resultarían ser de tipo monosacáridos, disacáridos o inclusive hasta oligosacáridos. Además existen compuestos con los que se unen frecuentemente como la glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, ácido glucurónico y galacturónico, así mismo pueden unirse a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos.

El ensayo de cloruro férrico dio positivo lo que permite evidenciar que existe fenoles y taninos en el presente extracto de *T. cacao*. De la misma manera se puede comparar con Vázquez-Ovando *et al.*, (2016: p. 244-245) donde refleja que estos compuestos son los responsables de proporcionar pigmentos a las flores y frutos, tolerancia al estrés biótico y abiótico, defensa contra la RUV dañina y también se relaciona con la calidad sensorial mientras que los taninos condensados se relaciona con la astringencia del cacao al momento de ser cosechado.

La prueba de Shinoda dio positivo para los extractos de *T.cacao* por lo que indica la presencia de flavonoides, coincidiendo con Morales, García and Méndez, (2012: pp. 80) donde exponen que químicamente está constituido por 7g de flavonoides, estos se acumulan en los pigmentos de los cotiledones de los granos de cacao actuando como antioxidantes ya que reduce la formación de radicales libre y la capacidad para estabilizar membranas. Incluso su contenido de flavonoides es más alto que el vino. De la misma manera Vázquez-Ovando *et al.*, (2016: p. 246) dice que la presencia de isoflavonoides poseen un gran efecto protector ante la RUV.

El ensayo de Antocianidina, el resultado fue positivo, coincidiendo con los estudios de Vázquez-Ovando *et al.*, (2016: p. 244), donde explica que el 4% representa al contenido total de

antocianidinas las cuales son las que proporcionan el color rojo, azul, violeta y púrpura de algunos frutos. De igual manera estos compuestos son responsables de la astringencia.

En los extractos de *T. cacao* se realizó el ensayo de Libermann-Burchard, dando positivo donde según Vázquez-Ovando *et al.*, (2016: p. 250) la presencia de triterpenos y esteroides representa en el cacao fresco un 3%, cacao seco un 4% y en el cacao tostado un 3%, pudiendo evidenciar que en el cacao seco se mantiene mejor los componentes químicos.

### 3.3 Parámetros de calidad del extracto

**Tabla 3-3.** Parámetros de calidad del extracto de semillas de *Theobroma cacao*.

Parámetro		Resultado de hojas
Requisitos organolépticos	Aspecto	Opalescente
	Color	Vino
	Olor	Alcohólico aromático
	Sabor	Amargo, ligeramente astringente
Densidad relativa		0.8113 ± 0,02
Índice de refracción		1.364
pH		6.81
Sólidos totales		0.7 ± 0,03

Realizado por: Johanna Romero, 2018

La tabla 3-3, presenta los parámetros organolépticos del extracto alcohólico, determinando las características de las semillas de *Theobroma cacao* y el solvente usado.

La densidad relativa para el extracto alcohólico de las semillas fue de  $0,81 \pm 0,02$ , mientras que la densidad relativa del solvente usado (etanol al 96%) fue de 0,96, un valor mayor para el extracto presumiblemente pueda deberse a la presencia de metabolitos disueltos, debido a que en el extracto los compuestos podrían estar formando puentes de hidrógeno.

El índice de refracción fue de 1,364 para semillas, mientras que el índice de refracción del agua es de 1, esta diferencia de 0,364 a favor del extracto de *T. cacao* demuestra la existencia de sustancias diluidas en el extracto.

El resultado para sólidos totales de las semillas fue de  $0.7 \pm 0,03$ , lo que permite considerar que los metabolitos secundarios puedan ser extraídos con el solvente, el valor obtenido no se puede comparar puesto que no se encuentra con suficiente información bibliográfica y es bajo debido a que la mayoría de compuestos son grasos.

El valor de pH para las hojas fue de 6.91, lo que revela que el extracto tiende a ser ligeramente ácido. El carácter ácido podría deberse a los compuestos que tienden a ser extraídos como flavonoides, fenoles, taninos, entre otros (Dehesa, 2011 p: 142-143).

### 3.4 Cuantificación de fenoles totales

La cuantificación de fenoles se realizó por espectrofotometría mediante el método de Folin – Ciocalteu, para lo cual se elaboró una curva de calibración de ácido gálico a concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm obteniéndose la siguiente ecuación de la recta  $A = 0,001C + 0,0017$  ( $R^2 = 0,999$ ).

Para calcular la concentración de fenoles totales en el extracto seco se sustituyó el valor de la absorbancia obtenida espectrofotométricamente a 100ppm (extracto seco de semillas), los resultados fueron expresados en mg Eq GAE/100 g de extracto seco.

**Tabla 4-3.** Cuantificación de fenoles totales por espectrofotometría.

Muestra analizada	Fenoles Totales	
	mg Eq GAE/100g de extracto seco	Porcentaje (%)
Semillas de <i>Theobroma cacao</i>	46966,666 ± 577,350	46,97 ± 0,577

Realizado por: Johanna Romero, 2018

**Tabla 5-3.** Concentración de fenoles totales en extracto metanólico de *T. cacao*

Muestra analizada	Fenoles Totales
	mg Eq GAE/100g de extracto metanólico
Semillas de <i>Theobroma cacao</i>	12101,46 mg Eq GAE/100 g.

Fuente: (Sotero et al., 2011: pp. 71-73).

De la tabla 4-3 y la tabla 5-3, se observa que la concentración de fenoles totales para las semillas de *T. cacao* es mayor que el valor obtenido en el estudio realizado por Sotero et al. (2011: pp. 71-73), la diferencia entre los datos se puede deber a la zona geográfica, variedad del suelo de donde se realizaron la recolección del material vegetal siendo: Ecuador y México respectivamente. La presencia de este tipo de compuestos es de gran importancia ya que

cumplen un papel esencial como agentes antioxidantes, además protegen contra los daños provocados por la RUV (Vázquez-Ovando *et al.*, 2016: p. 244-245).

### 3.5 Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó espectrofotométricamente mediante el método de tricloruro de aluminio, para lo cual se elaboró una curva de calibración con estándar de quercetina a diferentes concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm y se obtuvo la siguiente ecuación de la recta  $A = 0,0014C + 0,0144$  ( $R^2 = 0,9990$ ).

Para obtener la concentración de flavonoides totales en el extracto seco se sustituyó el valor de la absorbancia obtenida espectrofotométricamente a 100ppm del extracto seco de semillas, los cuales fueron expresados en mg Eq Q/100g de extracto seco y en porcentaje.

**Tabla 6-3.** Cuantificación de flavonoides totales por espectrofotometría.

Muestra a analizar	Flavonoides Totales	
	mg Eq Q/100 g Extracto seco	Porcentaje (%)
Semillas de <i>Theobroma cacao</i>	30819,80952 ± 125,3674	30,8198 ± 0,1253

Realizado por: Johanna Romero, 2018

**Tabla 7-3.** Concentración de flavonoides totales en extracto metanólico de *T. cacao*

Muestra analizada	Fenoles Totales
	mg Eq GAE/100g de extracto metanólico
Semillas de <i>Theobroma cacao</i>	2037,16 mg Eq Q/100 g Extracto

Fuente: (Sotero et al., 2011: pp. 71-73)

De la tabla 6-3 y tabla 7-3, se observa que la cantidad de flavonoides totales obtenidos en el extracto alcohólico de las semillas de *T. cacao* fue mayor que la cantidad de flavonoides totales presentados para la especie de *T. cacao* recolectada y analizada en México (Sotero et al., 2011: pp. 71-73). La diferencia que presentan los datos obtenidos se puede deber a la diversidad de condiciones climáticas, geográficas y riquezas de sus suelos.

### 3.6 Ensayo de Actividad Antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante de las semillas de *Theobroma cacao* se utilizó el método del DPPH<sup>•</sup>; el cual se fundamenta en la reducción de DPPH<sup>•</sup> a DPPH<sub>2</sub> por la aceptación de un átomo de hidrógeno (H), el (H<sup>+</sup>) es donado por la molécula antioxidante, el resultado final es el cambio de color de púrpura a amarillo, la lectura se realizó a una absorbancia de 515 nm. (Mishra et al., 2012c: p. 1041). Se calculó las concentraciones IC<sub>50</sub> utilizando el programa BLeSq.

**Tabla 8-3:** Resultados del IC<sub>50</sub>

Tipo de muestra	Resultado de IC <sub>50</sub>	Valores de Referencia para IC <sub>50</sub>
Semillas de <i>Theobroma cacao</i>	812,13 µg/ml	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Óptimo IC<sub>50</sub> &lt;15 µg mL<sup>-1</sup>)</li> <li>• Bueno 15µg mL<sup>-1</sup> &lt; IC<sub>50</sub> &lt; 50 µg mL<sup>-1</sup> )</li> <li>• Promedio 50 µg mL<sup>-1</sup> IC<sub>50</sub> &lt; 100 µg mL<sup>-1</sup>)</li> <li>• Débil IC<sub>50</sub> ≥100 µg mL<sup>-1</sup>)</li> </ul>

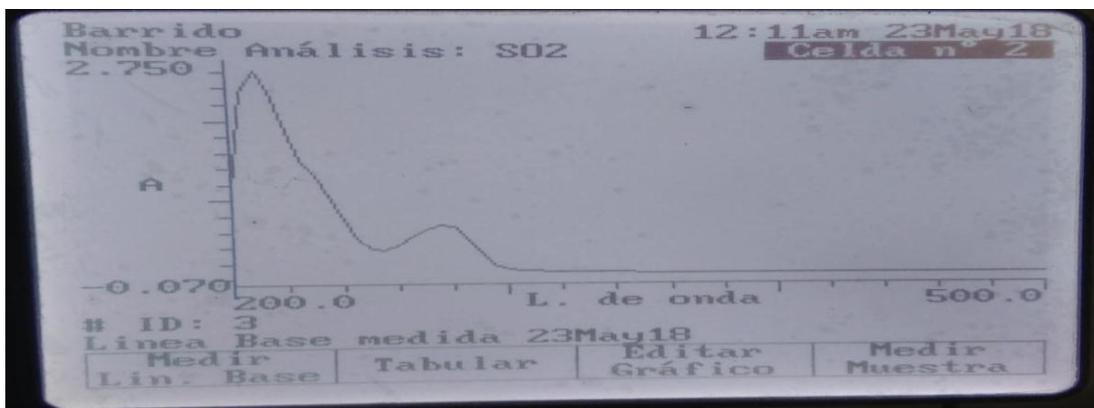
Realizado por: Johanna Romero, 2018

Fuente: (Sotero et al., 2011: pp. 71-73), (Barrera, 2017: pp. 49).

Los datos expresados en la tabla 8-3 indican un valor de IC<sub>50</sub> de 812,13 µg/ml para las semillas de *Theobroma cacao* los resultados se comparan con el estudio realizado por Sotero et al. (2011: pp. 71-73) en el cual se obtuvo un IC<sub>50</sub> de 500 µg/ml, el cual representa una mejor actividad de captación de radicales libres debido a que mientras menor sea el IC<sub>50</sub> de una muestra, mayor será su capacidad antioxidante (Cuvelier and Berset, 1995), (Anthony and Saleh, 2013).

Además se realizó una comparación con los valores de referencia para la clasificación de IC<sub>50</sub> propuestos por Francislene J, M. y Caneschi, C. (2016), en el cual nos demuestra que el resultado obtenido para el IC<sub>50</sub> de *T. cacao* presenta un valor débil.

### 3.7 Zonas de absorción ultravioleta del extracto etanólico de *Theobroma cacao*



**Fotografía 1-3** Picos de barrido espectrofotométrico del extracto etanólico de *Theobroma cacao*

Realizado por: Johanna Romero, 2018

En la figura 1-3 se puede observar que el extracto alcohólico de *Theobroma cacao*, la absorción de los compuestos fenólicos cubre la zona UV-B (280-320 nm) que comprende el 5% de la radiación, mientras que la zona UV-A (320-400 nm) se encuentra desprotegida y es el 95% restante de la radiación a la que se está expuesta a diario (González, Vernhes, & Sánchez, 2009: pp. 70-71), esta radiación es menos nociva pero igual se debe emitir una protección ante ello. Sin embargo según Morales & López, (2016: pp. 27) la radiación responsable de los daños causados en la piel por exposición solar en un 80% son los UV-B y el 20% son los UV-A; lo que quiere decir es que las respuestas biológicas están asociadas en ambas zonas de radiación lo cual se debe proteger para evitar el daños en el DNA de las células de la piel, fotoenvejecimiento e incluso el cáncer.

Por tal motivo y en base a lo observado en el barrido espectrofotométrico del extracto de *T. cacao*, analizando que no cubre la zona de absorción UV-A (320-400 nm), se optó por añadir óxido de zinc a las formulaciones para que refuerce su efecto fotoprotector generando un mayor campo de protección, ya que gracias a sus propiedades fotoquímicas transforma los rayos del sol en energía química y puede ser aplicado en cosméticos y productos farmacéuticos (Verdeja, García and Huerta, 2017. pp: 90-93).

### 3.8 Determinación del Factor de protección solar (FPS) *in vitro*

El factor de protección solar del extracto etanólico de los granos de *T. cacao* se evaluó mediante concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200, 500 y 1000 ppm, las mismas que se analizó en el ensayo de antioxidante. Como blanco se utilizó etanol al 96% y como control un protector comercial (Suncare FPS 100).

**Tabla 9. 3** Resultados del Factor de Protección Solar (FPS) *in vitro* del extracto de *T. cacao* y del protector solar Suncare FPS100

Concentración del extracto de <i>T. cacao</i>	FPS <i>in vitro</i>	Concentración del protector solar Suncare	FPS <i>in vitro</i>
<b>10</b>	0.05	<b>500</b>	18
<b>20</b>	0.16	<b>1000</b>	19
<b>50</b>	0.66		
<b>100</b>	0.98		
<b>200</b>	2.00		
<b>500</b>	5.32		
<b>1000</b>	10.55		

Realizado por: Johanna Romero, 2018

Los resultados expuestos en la tabla 9.3 se observa el FPS *in vitro* calculado mediante la ecuación de Mansur, (se utilizó este método debido a que se muestra a ser rápido y de fácil desarrollo) tanto del extracto de *T. cacao* como del protector solar comercial donde se puede apreciar que a mayor concentración mayor FPS. Cabe decir que el protector solar comercial contiene compuestos como etilhexil metoxicinamato (OMC) y octildimetil-PABA (Pamidao-O) (Suncare, 2018) los cuales son filtros solares químicos que pueden derivarse de acrilatos, benzimidazoles, benzofenonas, salicilatos, dibenzoilmetano y ésteres cinamatos permitidos actualmente por la FDA, poseen un mecanismos de acción de gran importancia ya que al formular se busca la protección ante los rayos UV-B y UV-A, y sobre todo que sea de mínima permeabilidad en la piel (Marín and Del Pozo, 2005).

Mientras que el extracto de *T. cacao* contiene compuestos naturales (polifenoles) (Vázquez-Ovando *et al.*, 2016: p. 244-245) que cubren estas zonas de radiación. Por lo tanto aunque haya una diferencia apreciable entre las concentraciones de 500 y 1000 ppm entre ambas muestras que presentan mayor FSP, se diría que el extracto de cacao tiene un buen FPS con respecto al protector solar comercial ya que su FPS es de 19 el máximo y no de 100 como esta en su presentación.

Por otro lado según Ávila Acevedo *et al.* (2005: pp. 301-309) dice que los filtros solares deben poseer un FPS mayor a 15 y propiedades antioxidantes; mientras que el Reglamento Técnico Mercosur al referirse de los protectores solares, dice que una formulación cosmética debe poseer un valor de FPS 6 como mínimo para considerarlo fotoprotector.

Lo que el extracto de *T. cacao* gracias a la cantidad de compuestos fenólicos que contiene justifica el uso como fotoprotector solar en las formulaciones elaboradas, ya que la actividad fotoprotectora no solo se guía en filtros químicos, físicos o naturales sino también a los excipientes que aporten un efecto protector (Inocente *et al.*, 2015. pp: 32).

### 3.9 Control de calidad del producto final

#### 3.9.1 Descripción organoléptica

**Tabla 10. 3** Descripción organoléptica de las formulaciones del protector solar de *Theobroma cacao*.

<b>Formulación</b> <b>Característica</b>	<b>Formulación 1</b>	<b>Formulación 2</b>	<b>Formulación 3</b>
<b>Aspecto</b>	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
<b>Color</b>	Marrón oscuro	Marrón claro	Beige
<b>Olor</b>	Chocolate	Almendrado	Chocolate

Realizado por: Johanna Romero, 2018.

#### 3.9.2 Control fisicoquímico

**Tabla 11. 3** Descripción del control fisicoquímico de las formulaciones del protector solar de *Theobroma cacao*.

<b>Formulación</b> <b>Característica</b>	<b>Formulación 1</b>	<b>Formulación 2</b>	<b>Formulación 3</b>	<b>Especificación USP# 35</b>
<b>Presencia de grumos</b>	No	No	No	-
<b>pH</b>	5.64	5.79	5.83	5.5 – 5.9
<b>Extensibilidad</b>	4.5 cm	5.5 cm	5.3 cm	< 7cm
<b>Tipo de emulsión</b>	Aceite/agua	Aceite/agua	Aceite/agua	-

Realizado por: Johanna Romero, 2018.

En la tabla 10.3 y tabla 11.3 se puede observar que las formulaciones presentadas del protector solar demostrarían que están dentro de las condiciones favorables y aptas para la piel humana. Se encuentra en un estado homogéneo sin alteraciones entre las fases ni grumos, de fácil esparcimiento, no produce manchas al aplicarse y sobre todo se encuentra dentro de los límites de pH (Alayo *et al.*, 2018).

Según Griffin, la emulsión gracias a sus compuestos autoemulsionantes como el alcohol cetílico brinda un 3% de HBL en la emulsión ya preparada y 20.69% de HBL en la fase oleosa, y aunque contenga aparte un agente emulsificante también proporciona estabilidad entre las fases y que difícilmente se separen.

Como la emulsión es una preparación termodinámica, con una apreciable inestabilidad debe tomarse en cuenta sus características físicas y químicas durante su vida útil.

### 3.9.3 Análisis microbiológico

**Tabla 12. 3** Descripción del control microbiológico de las formulaciones del protector solar de *Theobroma cacao*

Formulación	Formulación 1		Formulación 2		Formulación 3		Especificación NTE INEN 2867
Característica	Muestreo inicial	Muestreo final	Muestreo inicial	Muestreo final	Muestreo inicial	Muestreo final	
Presencia de aerobios	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Límite máximo de $5 \times 10^3$ ufc*/g o mL
Presencia de hongos	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Sin crecimiento	$\leq 50 \times 10^2$ ufc/g

Realizado por: Johanna Romero, 2018.

Según Cerra *et al.*, (2018. pp: 16) un cosmético se considera contaminado cuando hay la existencia de microorganismos patógenos, oportunistas, objetables entre otros o si presenta un deterioro fisicoquímico.

En este caso sería microorganismos objetables ya que son los responsables del deterioro del producto provocando la disminución de la eficacia y seguridad de los productos fármaco-cosméticos.

Por lo tanto, en la tabla 12.3 se puede evidenciar que el control microbiológico de las formulaciones son satisfactorios según la NTE INEN 2867, (2015: pp. 3), presentan inocuidad lo cual es importante para la seguridad de aplicación del cosmético final sobre la piel e indica que las formulaciones fueron desarrolladas con los requisitos sanitarios requeridos, ya que no presenta presencia de ningún tipo de microorganismo nombrados anteriormente.

### 3.9.4 Estabilidad acelerada

**Tabla 13. 3** Descripción del control de la estabilidad acelerada del producto final

<b>Formulación</b> <b>Característica</b>	<b>Formulación</b> <b>1</b>	<b>Formulación</b> <b>2</b>	<b>Formulación</b> <b>3</b>	<b>Especificación</b> <b>USP# 35</b>
<b>Presencia de grumos</b>	No	No	No	-
<b>pH</b>	5.63	5.70	5.81	5.5 – 5.9
<b>Extensibilidad</b>	4.8	5.7	6.7	< 7cm
<b>Separación de fases</b>	No	No	No	-

Realizado por: Johanna Romero, 2018.

Las características propias que determinan la inestabilidad de una emulsión puede ser reversible e irreversibles, dentro de la reversible está cremado que consiste en que la parte dispersa se ubica en la parte superior, la sedimentación la parte dispersa se ubica en la parte inferior y floculación los glóbulos formados no se fusionan entre sí; y en las irreversibles esta la coalescencia consiste en que los glóbulos formados se fusionan entre sí y la inversión de fases es cuando la fase continua pasa a discontinua y viceversa. Por lo tanto mediante los resultados de la tabla 13.3 se observa que los datos obtenidos de los análisis sensoriales y físicos químicos de las formulaciones expuestas a temperatura y humedad extrema, determinan que durante el período de 30 días no se ha ocurrido ninguno de estos efectos de inestabilidad y que según (Soares *et al.*, 2009: pp. 285) las formulaciones estarían siendo aptas e inocuas para la aplicación facial.

### 3.10 Análisis estadístico

Los resultados de la investigación fueron analizados mediante el sistema estadístico SPSS. Se realizó un análisis de modelo lineal general multivariante.

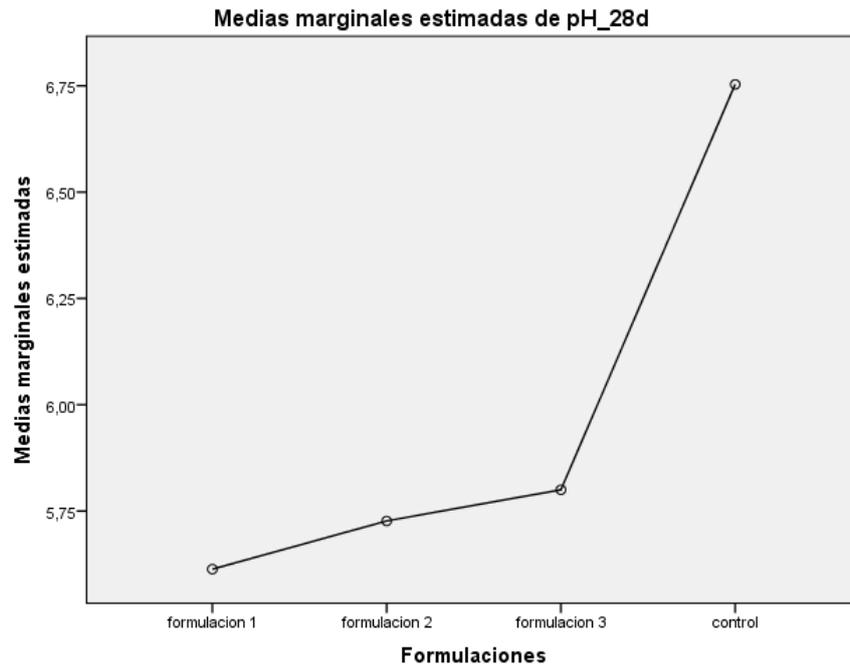
#### Planteamiento de hipótesis:

H<sub>0</sub>: No existen diferencias significativas entre las formulaciones fotoprotectoras. ( $P \geq 0.05$ )

H<sub>i</sub>: Existen diferencias significativas entre las formulaciones fotoprotectoras. ( $P \leq 0.05$ )

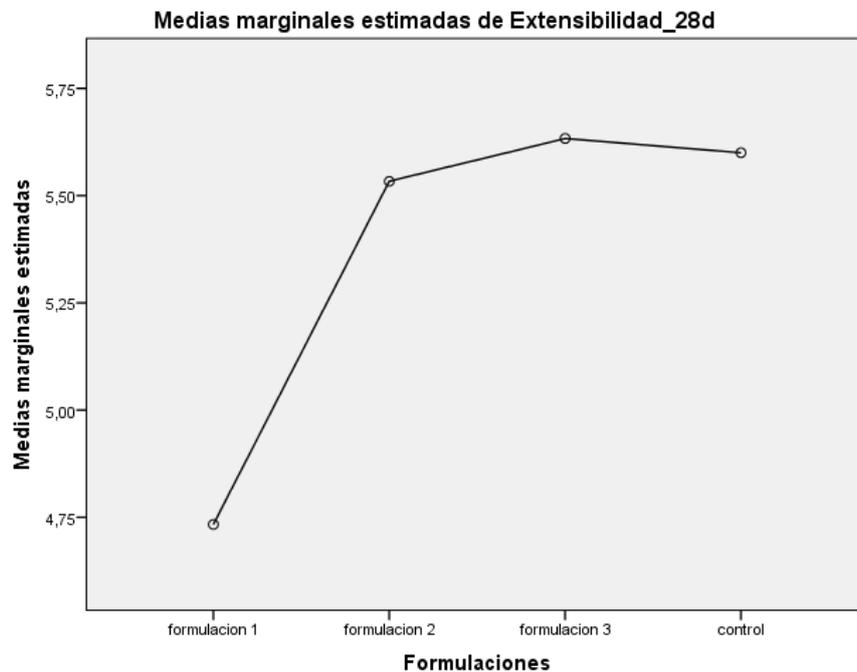
Con un valor de  $p = ,000$ ; rechazamos la hipótesis nula, existiendo diferencias significativas entre las formulaciones fotoprotectoras. Sin embargo, en el gráfico que se generó se observa que las formulaciones mantienen tanto un pH como la extensibilidad estable, respetando el rango

establecido por la USP#35 a diferencia del control (protector solar comercial) que sus valores sobrepasan los límites.



**Gráfico 1.3** Análisis del pH durante los 28 días expuestas a prueba de estabilidad

Realizado por: Johanna Romero, 2018



**Gráfico 1.3** Análisis del extensibilidad durante los 28 días expuestas a prueba de estabilidad

Realizado por: Johanna Romero, 2018

## CONCLUSIONES

Al realizar el control de calidad de la droga cruda vegetal de *Theobroma cacao*, se concluye que obtuvo un tratamiento adecuado durante el proceso de cosecha y almacenamiento, por lo que cumple con las normas según la USP#35.

En el tamizaje fitoquímico de las semillas de *Theobroma cacao* se observó la presencia de metabolitos como alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos, en mayor proporción compuestos grasos y en menor proporción compuestos como triterpenos y esteroides.

Se realizó la cuantificación de flavonoides y fenoles totales en el extracto alcohólico de las semillas de *Theobroma cacao*, donde se obtuvo valores muy significativos. De la misma manera se midió la capacidad antioxidante en la cual se observó que posee un valor débil según la clasificación de IC<sub>50</sub>.

Se elaboró un barrido espectrofotométrico de 200 a 400nm al extracto alcohólico de *Theobroma cacao*, donde se observó una cobertura únicamente de la zona UV-B, por lo que se optó en agregar óxido de zinc a las formulaciones por sus propiedades fotoquímicas que presenta.

Se valoró la calidad física, química y microbiológica de las distintas formulaciones del protector solar de *Theobroma cacao*, por lo que se concluye que son aptas e inocuas para su aplicación.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda completar la investigación con un test hacia personas voluntarias para certificar su eficacia.

Respaldar el producto con la realización de pruebas de toxicidad y genotoxicidad, para que en un momento dado pueda ser comercializado.

Como bioquímicos farmacéuticos tratar de explotar el uso y el desarrollo de nuestros productos nativos que sean de fácil acceso, para brindar información a las personas con falta de educación ante lo que se trata la protección solar, elaborando productos seguros, inocuos y eficaces.

Utilizar productos de producción nacional que poseen gran cantidad de metabolitos, capaces de cubrir las zonas de radiación solar que son perjudiciales para la salud humana, y más que todo que son de fácil acceso y de bajo valor económico.

## BIBLIOGRAFÍA

**ACS, American Cancer Society.** *¿Qué es el cáncer de piel tipo melanoma?* (2016)

**ACS, American Cancer Society.** “Cáncer de piel: células basales y células escamosas,” *American Cancer Society.* (2017a)

**ACS, American Cancer Society.** “Skin Cancer Fact Sheet.” (2017b)

**AEMET, Agencia Estatal de Meteorología Gobierno de España.** “La Radiación Solar.” (2015)

**Alayo, E. et al.** “Desarrollo de una crema de hojas de Piper aduncum L. (Piperaceae) con actividad fotoprotectora,” 25(1), (2018) pp. 115–126.

**Alhakmani, F., Kumar, S. And Khan, S. A.** “Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of Moringa oleifera,” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(8), (2013) pp. 623–627. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60126-4.

**Álvarez, C. et al.** “Evaluación De La Calidad Comercial Del Grano De Cacao (Theobroma Cacao L.) Usando Dos Tipos De Fermentadores,” 10(1), (2010) Pp. 76–87.

**Anthony, K. P. And Saleh, M. A.** “Free Radical Scavenging And Antioxidant Activities Of Silymarin Components,” (2013) Pp. 398–407. Doi: 10.3390/Antiox2040398.

**Ávila Acevedo, J. G. et al.** “Photoprotective Activity Of Buddleja Scordioides,” 76, (2005) Pp. 301–309. Doi: 10.1016/J.Fitote.2005.03.009.

**Ba, L. C., Hu, J. Y. And Wang, S. Q.** “The Role Of Antioxidants In Photoprotection: A Critical Review,” *Journal Of American Dermatology.* Elsevier Inc, 67(5), (2012) Pp. 1013–1024. Doi: 10.1016/J.Jaad.2012.02.009.

**Barrera, A.** “Determinación De La Actividad Fotoprotectora In Vitro De Zea Mays.” (2017)

**Beckett, S.** “El Ciencia Del Chocolate.” (2016)

**BOTÁNICA, Universidad Nacional del Nordeste.** “Familia Malvaceae,” (2016) pp. 210–213.

**CACAO,** Observatorio del *Origen y cultivo del cacao natural.* (2018)

**CACE, Consejo Argentino de Ciencias Estéticas.** “Biología de la Piel.” (2016)

**Cerra, H. et al.** *Manual de microbiología aplicada a la industria farmacéutica, cosmética y de productos médicos.*, (2018) pp. 544.

**Consalvo, L. et al.** “el envejecimiento cutáneo tampoco ! Envejecimiento Cutáneo,” (2006) pp. 1–15.

**Couteau, C., Diarra, H. And Coiffard, L.** “Effect of the product type, of the amount of applied sunscreen product and the level of protection in the UVB range on the level of protection achieved in the UVA range,” *International Journal of Pharmaceutics.* Elsevier B.V., 500(1-2), (2016) pp. 210–216. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.01.041.

**Cuéllar, O. and Guerrero, G.** “Actividad antibacteriana de la cáscara de cacao , Theobroma cacao L,” 17(3), (2012) pp. 3176–3183.

**Cuvelier, M. E. and Berset, C.** “Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity,” 30, (1995) pp. 25–30.

**Dehesa. M.** *Control De Calidad De Los Fitofármacos.* Quito, Ec. (2011)

**Eucerin.** “Estructura y función de la piel.” (2016)

**Gálvez, M. V.** “Antioxidants in Photoprotection : Do They Really Work ?,” *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition).* Elsevier, 101(3), (2010) pp. 197–200. doi: 10.1016/S1578-2190(10)70617-X.

**Gilaberte, Y. et al.** “Fotoprotección,” 94(5), (2003) pp. 271–293.

**Gilaberte, Y. and González, S.** “Novedades en fotoprotección,” 101(8), (2010) pp. 659–672. doi: 10.1016/j.ad.2010.04.003.

**González, M., Vernhes, M. and Sánchez, Á.** “La radiación ultravioleta su efecto dañino y consecuencias para la salud humana,” 18(2), (2009) pp. 69–80.

**Guavita, D.** “Fototipos cutáneos,” (2014) pp. 30–32.

**Gutiérrez, A.** “Chocolate , Polifenoles y Protección a la Salud,” 21(2), (2002) pp. 149–152.

**Healthwise.** *Carcinoma de células basales y escamosas.* (2017)

**HL.SUN, Health Innovation Sun.** “Fototipo de piel.” (2015)

**INAMHI, Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología.** *Altos niveles de radiación solar ocasionaron incremento en los índices Ultravioleta y niveles de Ozono.* (2017)

**Inocente, M. C. et al.** “Compuestos fenólicos , actividad antioxidante y fotoprotectora in vitro de una crema gel elaborada con extracto estabilizado de tumbo serrano (*Passiflora mollissima* HBK),” 17, (2015) pp. 27–34.

**Inzunza, J.** “Radiación solar y terrestre.” (2013)

**Kalvatchev, Z., Garzaro, D. And Guerra, F.** “Teobroma cacao: Un nuevo enfoque para nutrición y salud,” (2008) pp. 23–25.

**Kaplan, L. E. E. A.** “Suntan , sunburn , and sun protection uve uve,” *Journal of Wilderness Medicine.* Elsevier, 3(2), (2017) pp. 173–196. doi: 10.1580/0953-9859-3.2.173.

**Kaur, I. P., Kapila, M. And Agrawal, R.** “Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing,” 6, (2017) pp. 271–288. doi: 10.1016/j.arr.2007.08.006.

**Lattar, E. et al.** “Estudios Morfo - Anatómicos en nectarios florales y extraflorales,” 44, (2009) pp. 33–41.

**Lim, H. W.** “Challenges in photoprotection: Introduction,” *Journal of American Dermatology.* Elsevier Inc, 76(3), (2017) pp. S89–S90. doi: 10.1016/j.jaad.2016.09.037.

**Lim, H. W., Arellano, M. I. And Stengel, F.** “Current challenges in photoprotection,” *Journal of American Dermatology.* Elsevier Inc, 76(3), (2017) pp. S91–S99. doi: 10.1016/j.jaad.2016.09.040.

**Mandal, A.** “Causas del Cáncer de Piel,” *News Medical Life Sciences,* (2017) pp. 1–5.

**Marín, D., Del Pozo, A.** “Filtros solares. Características, tipos y requerimientos,” 24(9), (2005) pp. 175–177.

**Matsui, M. S. et al.** “Non-Sunscreen Photoprotection: Antioxidants Add Value to a Sunscreen,” *Journal of Investigative Dermatology*. Elsevier Masson SAS, 14(1), (2009) pp. 56–59. doi: 10.1038/jidsymp.2009.14.

**Mazariegos, Y.** *El cultivo del cacao en el sur de México*. (2009)

**Miranda, M.** *Farmacognosia y productos naturales*. Edited by F. Varela. La Habana Cuba. (2006)

**Montero, J.** “Fotoprotección: filtros solares,” *Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos*, (2016) pp. 1–153.

**Morales, C., López, M.** “Efectos de la radiación ultravioleta (UV) en la inducción de mutaciones de p53 en tumores de piel,” 29(7), (2016) pp. 25–32.

**Morales, J. de J., García, A. and Méndez, E.** “¿Qué sabe usted acerca de...Cacao?,” *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43, (2012) pp. 79–81.

**NTE INEN 2867.** “Productos Cosméticos. Requisitos.” (2015)

**Ochoa, M.** *Biblioteca digital: Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana*. (2016)

**OFFARM, Formación Permanente en Dermofarmacia.** “Pigmentación de la piel ( I ). Melaninas : conceptos generales e implicaciones cosméticas,” 24(I), (2005) pp. 116–118.

**OMS, Organización Mundial De La Salud.** “SOLAR MUNDIAL.” (2014)

**OSAB, Observatorio de Salud Ambiental Bogotá.** “La radiación ultravioleta y sus efectos en la salud,” (2000) pp. 1–4.

**Palacios, L. and Mallo, S.** “Fotoprotección,” (2015) pp. 33 – 53.

**Petersen, B. et al.** “Sun and Ski Holidays Improve Vitamin D Status , but Are Associated with High Levels of DNA Damage,” *Journal of Investigative Dermatology*, 134, (2014) pp. 2806–2813. doi: 10.1038/jid.2014.223.

**Sambandan, D. R. and Ratner, D.** “Sunscreens: An overview and update,” *Journal of American Dermatology*. American Academy of Dermatology, Inc., 64(4), (2011) pp. 748–758. doi: 10.1016/j.jaad.2010.01.005.

**Scapagnini, G.** *Agroalimentando: Compuestos Bioactivos del Cacao como potentes agentes antienvjecimiento.* (2017)

**SCF, Skin Cancer Foundation.** *Melanoma.* (2018)

**SMG, Aesthetics Medical Group.** “Anatomía y Fisiología de la Piel.” (2014)

**SOARES, G. et al.** “Preparación de un protector solar y evaluación de la acción fotoprotectora del propóleo verde del Vale do Aço , Minas Gerais, Brasil,” 8(4), (2009) pp. 282–288.

**Sotero, V. et al.** “Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos.,” 77(1), (2011) pp. 66–74.

**SUNCARE.** *Suncare es proteccion avanzada para toda tu familia.* (2018)

**Vázquez-Ovando, A. et al.** “Alcaloides y polifenoles del cacao , mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma,” (2016) pp. 66.

**Verdeja, L. F., García, P. And Huerta, M.** “El óxido de zinc: propiedades y aplicaciones,” (January), (2017) pp. 87–96.

**Waizel-Haiat, S. et al.** “Cacao y chocolate : seducción y terapéutica,” (2012) pp. 57.

**WMO, Worl Meteorological Organization.** *UV index.* (2018)

**Young, A. R.** “Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection,” (2017) pp. 100–109. doi: 10.1016/j.jaad.2016.09.038.

## ANEXOS

**Anexo A:** Lugar de recolección y proceso de secado de las semillas de *T. cacao*

Gráfico 1A Lugar de recolección



Gráfico 2A Granos de cacao

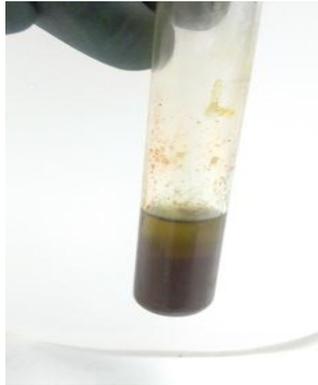


**Anexo B:** Extracto obtenido de las semillas de cacao y resultado fitoquímico

Gráfico 1B Extracto hexánico



Gráfico 2B Resultado fitoquímico: LIBERMAN(POSITIVO ++)



**Anexo C:** Concentración y extracto seco del cacao.

Gráfico 1C Concentración del extracto alcohólico de *T. cacao*



Gráfico 2C Extracto seco de *T. cacao*



**Anexo D:** Muestras de fenoles, flavonoides y antioxidante.

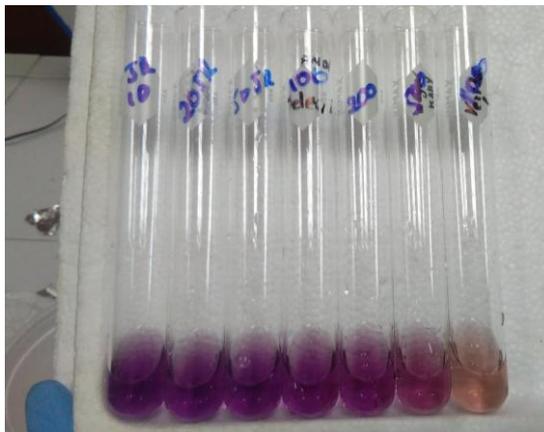
Gráfico 1C Muestra de fenoles



Gráfico 2C Muestra de flavonoides



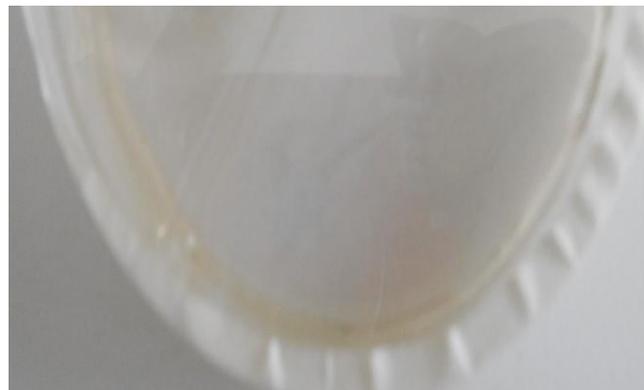
Gráfico 3C Muestra de antioxidante



**AnexoE:** Formulaciones fotoprotectoras



**AnexoE:** Análisis microbiológico de las formulaciones fotoprotectoras



**Anexo F:** Prueba modelo lineal general multivariado para el análisis de pH en las formulaciones fotoprotectoras.

Formulaciones	pH_inicial	2,575	3	,858	246,427	,000
	pH_7d	2,682	3	,894	16,546	,001
	pH_21d	2,487	3	,829	1105,185	,000
	pH_28d	2,487	3	,829	1105,185	,000

**Anexo G:** Prueba modelo lineal general multivariado para el análisis de extensibilidad en las formulaciones fotoprotectoras.

Formulaciones	Extensibilidad_inicial	2,913	3	,971	582,667	,000
	Extensibilidad_7d	1,710	3	,570	.	.
	Extensibilidad_14d	1,663	3	,554	221,667	,000
	Extensibilidad_28d	1,663	3	,554	221,667	,000