

### ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y EFECTO GENOTÓXICO DE LAS SEMILLAS DE *Theobroma cacao* L. "CACAO". AYACUCHO - 2018

Edwin Enciso Roca, Enrique Aguilar Felices, Pablo Común Ventura

Unidad de Investigación de Ciencias de la Salud

E-mail: enrique.aguilar@unsch.edu.pe

#### RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó con el objetivo de determinar la actividad antioxidante y genotoxicidad de las semillas de *Theobroma cacao* L. Las variedades fueron amarillo, rojo, cacao 9,9, VRAEM12, VRAEM15, CCN-51, criollo y colombiano. Las semillas fueron recolectadas en el Centro Poblado de Manitea, distrito de Kimbiri, región Cusco. El método utilizado para determinar fenoles totales fue Folin – Ciocalteu, para flavonoides, el método del cloruro de aluminio, la actividad antioxidante por los métodos de DPPH y ABTS, la toxicidad aguda oral mediante el método de dosis límite a 2000 mg/kg y el ensayo de genotoxicidad mediante la inducción de micronúcleos en ratón. La variedad criollo tuvo mayor contenido de fenoles totales (80,43 mg EAG/g) y la variedad amarillo menor contenido (54,32 mg EAG/g) ( $p < 0,05$ ). La variedad CCN-51 tuvo mayor contenido de flavonoides (49,12 mg EQ/g) y la variedad amarillo menor contenido (34,62 EQ/g) ( $p < 0,05$ ). Las variedades VRAEM15, criollo, rojo, VRAEM12 y CCN-51 mostraron mayor actividad antioxidante que las variedades cacao 9,9, colombiano y amarillo ( $p < 0,05$ ). El ensayo de toxicidad aguda no mostró signos tóxicos ni causó la muerte de los animales ni alteración en el peso corporal. En los estudios de genotoxicidad no hubo variación estadística significativa en comparación con el control del porcentaje de micronúcleos en eritrocitos de ratón ( $p < 0,05$ ). Se concluye que las semillas de *Theobroma cacao*, tiene alto contenido de compuestos fenólicos, flavonoides, buena actividad antioxidante y no presentan genotoxicidad por ensayo de micronúcleos en ratón.

Palabras clave: *Theobroma cacao* L., compuestos fenólicos, flavonoides, actividad antioxidante, genotoxicidad, micronúcleos.

### ANTIOXIDANT ACTIVITY AND GENOTOXIC EFFECT FROM THE SEEDS OF *Theobroma Cacao* L. "COCOA". AYACUCHO - 2018

#### ABSTRAC

The present research work was carried out with the objective of determining the antioxidant activity and genotoxicity of the seeds of *Theobroma cacao* L. The varieties were yellow, red, cacao 9.9, VRAEM12, VRAEM15, CCN-51, Creole and Colombian. The seeds were collected in the Manitea Town Center, Kimbiri district, Cusco region. The method used to determine total phenols was Folin - Ciocalteu, for flavonoids, the aluminum chloride method, the antioxidant activity by the DPPH and ABTS methods, the acute oral toxicity by the limit dose method at 2000 mg / kg and the genotoxicity essay by the induction of micronuclei in mouse. The Creole variety had a higher content of total phenols (80.43 mg EAG/g) and the yellow variety contained less (54.32 mg EAG/g) ( $p < 0.05$ ). The CCN-51 variety had a higher flavonoid content (49.12 mg EQ / g) and the yellow variety with a lower content (34.62 EQ/g) ( $p < 0.05$ ). Varieties VRAEM15, creole, red, VRAEM12 and CCN-51 showed higher antioxidant activity than cacao varieties 9.9, Colombian and yellow ( $p < 0.05$ ). The acute toxicity test showed no toxic signs or caused the death of animals or alteration in body weight. In the genotoxicity studies there was no significant statistical variation compared to the control of the percentage of micronuclei in mouse erythrocytes ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the seeds of *Theobroma cacao*, have high content of phenolic compounds, flavonoids, good antioxidant activity and do not present genotoxicity by micronucleus essay in mouse.

Keywords: *Theobroma cacao* L., phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, genotoxicity, micronuclei.

#### INTRODUCCIÓN

La región andina y amazónica de nuestro país posee una variada flora y dentro de ella, muchas especies con reconocida actividad benéfica para la salud. Entre estos encontramos al *Theobroma cacao* L. "cacao, que es un

alimento rico en minerales, vitaminas y fibra, que ofrece numerosos beneficios. Además, tiene propiedades nutricionales y terapéuticas.

El cacao (*Theobroma cacao* L.), es una especie nativa de los bosques tropicales húmedos de América del sur. Sus

poblaciones ostentan una amplia diversidad genética (entre y dentro de ellas), tanto al estado silvestre como cultivado<sup>1</sup>.

El cacao rico en polifenoles, flavonoides y antioxidantes buenos para la salud, tienen efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular y la presión arterial<sup>2</sup>.

El cacao es muy rico en polifenoles con propiedades antioxidantes que son compuestos naturales capaces de prevenir la acción negativa de los radicales libres en nuestro organismo, ayudando a prevenir la degeneración de nuestras células (responsables de la aparición de enfermedades). Por esta riqueza en antioxidantes el cacao es ideal para nuestro sistema cardiovascular, previniendo la aparición de enfermedades del corazón<sup>3</sup>.

Los compuestos fenólicos actualmente han despertado un gran interés debido a sus propiedades antioxidantes y sus posibles implicaciones beneficiosas en la salud humana, tales como el tratamiento y prevención del cáncer, enfermedades cardiovasculares y otras patologías de carácter inflamatorio<sup>4</sup>.

El ensayo de micronúcleos es una alternativa al test de aberraciones cromosómicas convencional, en el que se analizan las alteraciones presentes en metafases mitóticas y permite detectar aberraciones cromosómicas que responden a alteraciones de tipo estructural (efecto clastogénico) o alteraciones numéricas (efecto aneugénico) del agente en estudio. Para llevar a cabo una adecuada evaluación genotóxica es necesario emplear un ensayo in vivo con el objetivo de que propiedades metabólicas y toxicocinéticas estuvieran en condiciones semejantes al hombre, para esto se seleccionó el ensayo de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón, prueba validada internacionalmente que detecta daño cromosomal<sup>5</sup>.

En las últimas décadas, la integridad genética de la población humana se ha visto comprometida por la gran actividad industrial, que provoca la exposición a productos químicos, plantas medicinales y agentes genotóxicos. Además, existen otros factores capaces de influir en la integridad cromosómica tales como el estilo de vida, los cambios climáticos (debido al progresivo debilitamiento de la capa de ozono), los tratamientos médicos, algunos polimorfismos genéticos, etc. Es importante, por todo ello, determinar qué se conoce como un nivel “aceptable” de daño genético en una población concreta, realizar ensayos de genotoxicidad de manera rutinaria y monitorizar aquellos individuos que, por su ocupación laboral o estilo de vida, se encuentran más expuestos o con mayor riesgo de sufrir alteraciones capaces de modificar su estabilidad genética<sup>6</sup>.

Por lo expuesto se planteó como objetivo determinar la actividad antioxidante y efecto genotóxico de las semillas de *Theobroma cacao* L. “cacao”.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Tipo de investigación

La investigación fue de tipo descriptivo para evaluar la actividad antioxidante y experimental para la evaluar la genotoxicidad.

### Variables

Las variables son el contenido de compuestos fenólicos expresados como ácidos fenólicos y flavonoides presentes en las semillas de ocho variedades de *Theobroma cacao* L. “cacao” a quienes se evaluó su actividad antioxidante.

La variable al evaluar la genotoxicidad fue el extracto hidroalcohólico a las dosis de 500 y 1000 mg/kg de peso corporal.

### Población

Semillas de *Theobroma cacao* L. de ocho variedades, obtenidas del Centro Poblado de Manitea, distrito de Kimbiri, provincia La Convención, región Cusco. Dichas variedades estuvo conformado por: amarillo, rojo, cacao 9,9, VRAEM12, VRAEM15, CCN-51, criollo y colombiano.

### Muestra

500 g de semillas de cada una de las variedades.

Ratones hembras y machos, que fueron adquiridos en el Instituto Nacional de Salud Chorrillos, los cuales fueron transportados al Bioterio de Farmacia para su adaptación por siete días a temperatura ambiental con dieta balanceada y agua a voluntad.

### Tipo de muestreo

Se utilizó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

### Métodos para la recolección de datos

#### Obtención de las semillas

Las semillas fueron retiradas de la vaina de cada especie y desecadas a temperatura ambiente. Las semillas desecadas fueron trituradas utilizando un molino de grano, siendo almacenadas en recipientes limpios y secos; y conservadas en refrigeración hasta su utilización.

#### Obtención del extracto

Para la determinación de fenoles totales, flavonoides y actividad antioxidante se pesó 5 gramos de la semilla trituradas y se realizó la extracción con 50 mL de metanol con la ayuda de un agitador por el espacio de 4 horas. Luego se filtró y se llevó a una fiola de 50 mL y se enrasó a volumen con metanol. Los extractos fueron conservados en refrigeración.

Para obtener los extractos hidroalcohólicos de dos variedades de las semillas, se pesó 500 g de cada uno, los cuales se maceraron con 800 mL de alcohol al 80% por siete días con agitación constante. Durante el proceso se agitó periódicamente para su distribución homogénea de la muestra<sup>7</sup>. El extracto hidroalcohólico fue concentrado en baño maría a 50 °C y guardados en frascos de color ámbar para su posterior análisis.

#### Determinación del contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue determinado utilizando el reactivo Folin – Ciocalteu (Merck), siguiendo el método descrito por Makkar, 2013 citado por Thangaraj, 2016. 50 µL de los extractos obtenidos fueron mezclados con 0,5 mL del reactivo de Folin – Ciocalteu 1N y 2,5 mL de solución de carbonato de sodio al 5%. La mezcla fue incubada en la oscuridad por 40 minutos a temperatura ambiente (20 °C).

Después de la incubación, la absorbancia fue medida a 725 nm utilizando un espectrofotómetro UV – Vis GENESYS 6. Se preparó una curva de calibración con ácido gálico a partir de una solución de trabajo de 50 µg/mL (0,2: 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 mL). Los resultados fueron expresados en mg equivalentes a ácido gálico por g de muestra (mg EAG/g de muestra).

#### **Determinación del contenido de flavonoides**

El contenido de flavonoides fue determinado utilizando el método descrito por Zhishen y col. (1999) con ligeras modificaciones, que es descrito por Thangaraj (2016)<sup>8</sup>. 0,50 mL de una alícuota del extracto fue mezclado con 0,50 mL de agua destilada y 0,15 mL de solución de nitrito de sodio al 5% en un tubo de ensayo. Después de 5 minutos, 0,15 mL de solución de cloruro de aluminio al 10% fue adicionado. A los 6 minutos, 2,0 mL de hidróxido de sodio al 4% fue adicionado a la mezcla. Inmediatamente, la solución fue completada hasta 5,0 mL con agua destilada y completamente mezclada. La absorbancia de la mezcla final fue determinada a 510 nm contra un blanco de la reacción. Se preparó una curva de calibración con quercetina a partir de una solución de trabajo de 200 µg/mL (0,2: 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mL). El contenido de flavonoides de los extractos fue expresado como mg equivalentes a quercetina/g de muestra (mg EQ/g).

#### **Determinación de la actividad antioxidante por el método de secuestro del radical libre 1,1 – difenil – picril – hidrazilo (DPPH)**

Se utilizó el método descrito por Brand – Williams y col. (1995) citado por Carciocchi y col. (2010)<sup>9</sup>. En resumen, a una alícuota del extracto (150 µL) de extracto se adicionó a 2950 µL de una solución metanólica del radical libre DPPH (20 mg/L) con una absorbancia ajustada a  $1,1 \pm 0,02$  nm leída a 517 nm. Después de la agitación, la mezcla fue incubada en la oscuridad por 30 minutos y la absorbancia medida a 517 nm en un espectrofotómetro UV – Vis GENESYS 6. Se preparó una curva estándar con Trolox (25 – 800 µmol). Los resultados son expresados como µmoles equivalentes a Trolox por gramo de muestra (µmol ET/g de muestra).

#### **Determinación de la actividad antioxidante por el método de secuestro del catión radical del ácido 2,2'-azinobis – (3 – etilbenzotiazolina) – 6 - sulfónico (ABTS.+)**

Se utilizó el procedimiento descrito por Arnao y col. (2001) modificado por Thaipong y col. (2006)<sup>10</sup>. Para el cual se preparó una solución patrón (SP) constituida por 7,4 mM de ABTS y 2,6 mM de persulfato de potasio a los cuales se dejó que reaccionen por 12 horas. La solución de trabajo (ST) fue preparada a partir de 1 mL de SP disuelto en metanol y se ajustó la absorbancia a  $1,1 \pm 0,02$  mL, diluyendo con metanol a una longitud de onda de 734 nm. La muestra (150 µL) fue mezclado con 2850 µL de solución de ABTS y se dejó que reaccionen en la oscuridad por 2 horas y se leyó la absorbancia a 734 nm. Se preparó una curva estándar con Trolox (25 – 600 µmol). Los resultados son expresados como µmol equivalentes de Trolox/g de muestra (µmol ET/g de muestra).

#### **Toxicidad aguda oral en ratones**

Método: Test N° 423 Método clásico de la OECD (2001)<sup>11</sup>

El ensayo se llevó a cabo según el método de la clase tóxica

aguda descrito en la normativa N° 423 de la OECD, para lo cual previamente los animales fueron aclimatados y alojados con libre acceso a agua y alimento con temperatura ambiental entre 21-25 °C y 50 y 60% de humedad con 12 horas de luz/oscuridad. Posteriormente, los animales fueron sometidos a ayuno con libre acceso de agua seis horas antes del ensayo. Se formó un grupo de 10 animales conformado por machos y hembras, a los cuales se le administró por vía oral la sustancia de prueba a la dosis de 2000 mg/kg de peso corporal, y a otro grupo de 10 animales se les administró 0,3 mL de agua destilada (grupo control).

La administración del extracto hidroalcohólico se llevó a cabo, previo ayuno de 6 h, en una sola dosis disolviendo 2 g del extracto en 10 mL de agua destilada.

Los animales fueron observados constantemente durante las primeras 24 h y después una vez al día hasta los 14 días; se registró la aparición y duración de cualquier síntoma tóxico, el peso corporal se anotó al inicio del estudio y semanalmente. Al concluir el período experimental se sacrificaron los animales por sobredosis de pentobarbital sódico.

#### **Evaluación de la genotoxicidad**

Método: Tets N° 474 (ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero 1997)<sup>12,13</sup>.

El ensayo de micronúcleos se realizó en ratones (*Mus musculus*) albinos procedentes del Instituto Nacional de Salud, de 25 a 30 g de peso corporal, para lo cual se formaron seis grupos de seis animales cada uno de ambos sexos.

Los animales estuvieron agrupados por grupo control, ciclofosfamida, dosis de 500 y 1000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de cada una de las variedades VRAEM15 y criollo.

Durante el experimento los animales recibieron agua y comida (ratonina peletizada) sin restricción y se mantuvieron en condiciones de humedad y temperaturas convencionales.

Como control positivo se utilizó ciclofosfamida disuelto en suero fisiológico, a una dosis única de 40 mg/kg, administrada por vía intraperitoneal.

Los tratamientos fueron administrados dos veces al día durante 48 horas, para luego proceder a eutanazar con pentobarbital 100 mg/kg, este tiempo de estudio está basado en la cinética de maduración de los eritrocitos en ratones.

El procedimiento empleado para la obtención de las preparaciones de sangre periférica fue utilizado de acuerdo a la metodología propuesta Schmid *et al.*, 1976. Se tomó pequeñas muestra de sangre periférica, debiendo realizar frotis de sangre, secado en horas de los mismos para luego ser teñidos con colorante Giemsa al 5% previa fijación etanol de 95°. Posteriormente se tiñeron con Giemsa al 5% (v/v) en agua corriente durante aproximadamente 20 min. Se contó a aproximadamente 1000 eritrocitos por individuo, en campos oculares a 400 aumentos a fin de observar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos maduros o inmaduros. Los datos fueron expuestos en porcentaje de micronúcleos.

**Diseño de investigación**

Se empleó el diseño de posprueba únicamente, varios grupos y uno de control <sup>14</sup>.

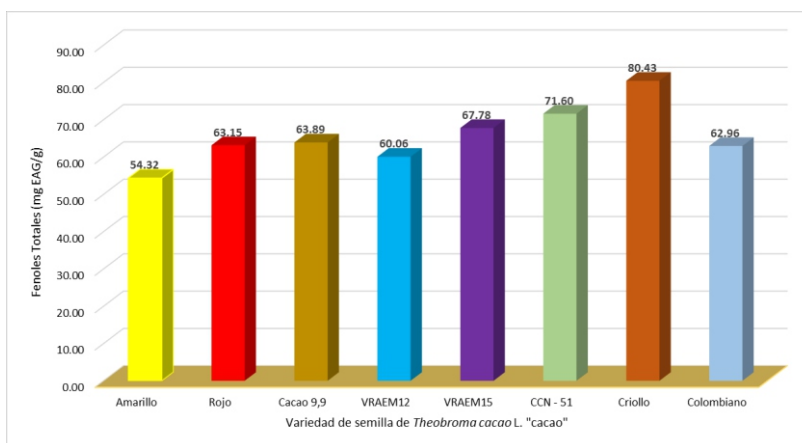
|     |    |    |
|-----|----|----|
| RG1 | X1 | O1 |
| RG2 | X2 | O2 |
| RGc | -  | Oc |

- G1, 2 : Grupo tratamiento
- Gc : Grupo control
- X : Tratamiento
- O : Medición

**Análisis de datos**

Los datos obtenidos se presentan como medias ± desviación estándar y representada en figuras. Las diferencias entre las medias se analizaron mediante el análisis de varianza de un solo factor y la prueba de comparaciones múltiples de Scheffé con un nivel de confianza de 95%. La significancia estadística del peso corporal de los ratones, se estimaron haciendo uso de ANVA y el porcentaje de micronúcleos mediante la prueba de Dunnett con un nivel de confianza del 95%, para el cual se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 21.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

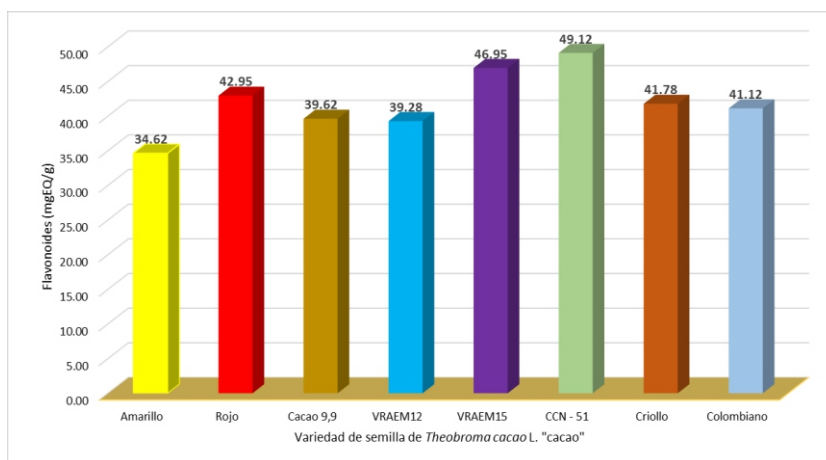


ANOVA p=0.000 (p<0.05)

Figura 1. Contenido de fenoles totales de la semilla de ocho variedades de *Theobroma cacao* L. "cacao". Ayacucho – 2018.

Las semillas de las ocho variedades de *Theobroma cacao* L., tienen diferente contenido de fenoles totales (Figura 1), siendo estas diferencias altamente significativas. Las variedades amarillo y VRAEM12 tienen el menor contenido; mientras que, la variedad criollo tiene el mayor contenido.

En una revisión del contenido de polifenoles en las semillas de *Theobroma cacao* L., estas varían entre 40 mg GAE/g hasta 84,2 mg GAE/g en semillas de diferentes regiones geográficas <sup>15</sup>. Nuestros resultados están dentro de ese intervalo.

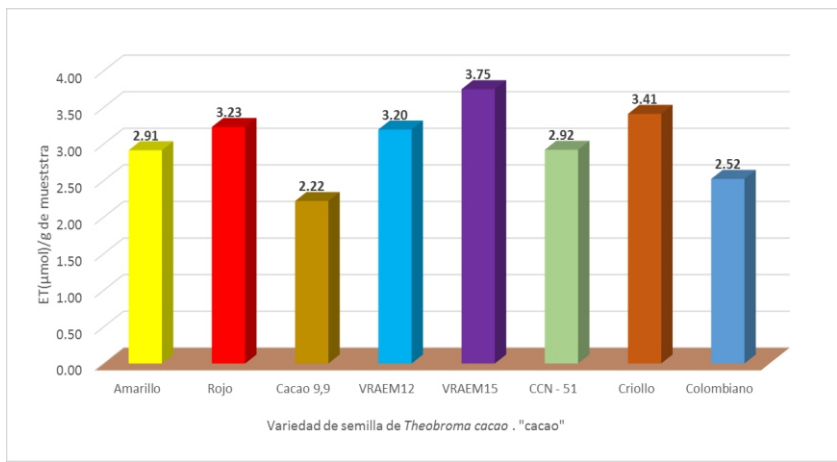


ANOVA p=0.000 (p<0.05)

Figura 2. Contenido de flavonoides de la semilla de ocho variedades de *Theobroma cacao* L. "cacao". Ayacucho – 2018.

Asimismo, el contenido de flavonoides en las semillas, varían entre las variedades, siendo esta diferencia también altamente significativa. Las variedades amarillo, VRAEM12, cacao 9,9 y colombiano muestran el menor contenido, mientras que, las variedades rojo, VRAEM15 y CCN tienen el mayor contenido de flavonoides

respectivamente. El contenido de flavonoides (catequinas, procianidinas, flavanoles y flavonoles) está en el intervalo de 37,19 mg/g hasta 55,24 mg/g de semilla pulverizada, procedente de diferentes regiones geográficas<sup>15</sup>. Nuestros hallazgos también se encuentran en ese rango.

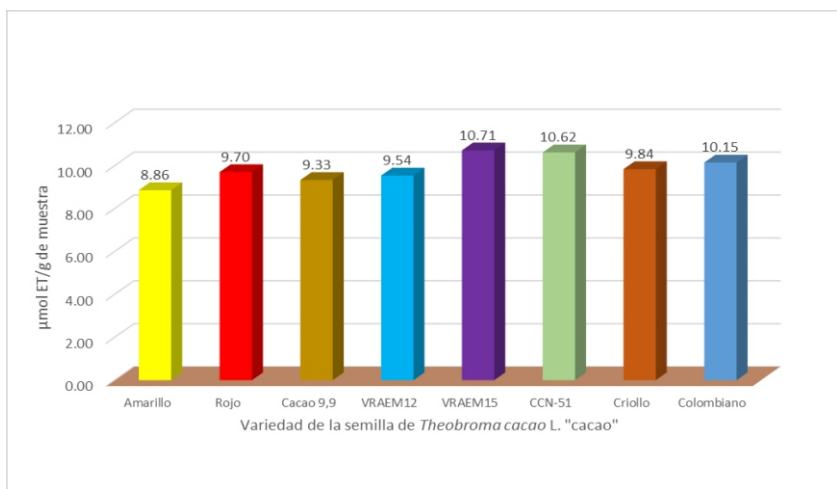


ANOVA p=0.000 (p<0.05)

Figura 3. Capacidad secuestradora del radical libre DPPH de la semilla de ocho variedades de *Theobroma cacao* L. "cacao". Ayacucho – 2018.

La capacidad secuestradora del radical libre DPPH de los extractos de las semillas de ocho variedades expresada como µmol ET/g de muestra, mostraron diferencias significativas

entre las variedades. La variedad cacao mostró menor capacidad secuestradora, mientras que, la variedad VRAEM15 mostró la mayor actividad.



ANOVA p=0.000 (p<0.05)

Figura 4. Capacidad secuestradora del radical libre ABTS de la semilla de ocho variedades de *Theobroma cacao* L. "cacao". Ayacucho – 2018.

Por otro lado, La capacidad secuestradora del radical libre ABTS de los extractos de las semillas de ocho variedades expresada como µmol ET/g de muestra, mostraron diferencias significativas entre las variedades. La variedad

amarillo mostró menor capacidad secuestradora, mientras que, la variedad VRAEM15 mostró la mayor seguida de CCN-51.



**Tabla 1.** Comportamiento general de los ratones a la dosis de 2000 mg/kg con extracto hidroalcohólico de *Theobroma cacao* L. “cacao”, variedades VRAEM15 y criollo, Ayacucho 2018.

| Dosis/Comportamiento general          | Grupo control | Extracto 2000 mg/kg VRAEM15 | Extracto 2000 mg/kg Criollo |
|---------------------------------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Disminución actividad motora          | 0/10          | 0/10                        | 0/10                        |
| Aumento de actividad motora           | 0/10          | 08/10                       | 06/10                       |
| Perdida de reflejos de enderezamiento | 0/10          | 0/10                        | 0/10                        |
| Lagrimación                           | 0/10          | 0/10                        | 0/10                        |
| Mucosas pálidas                       | 0/10          | 0/10                        | 0/10                        |
| Mucosas hiperémicas                   | 0/10          | 1/10                        | 1/10                        |
| Erección de la cola                   | 0/10          | 6/10                        | 5/10                        |
| Piloerección                          | 0/10          | 5/10                        | 6/10                        |
| Diarrea                               | 0/10          | 0/10                        | 0/10                        |
| Agresivo                              | 2/10          | 0/10                        | 0/10                        |
| Atemorizado                           | 0/10          | 0/10                        | 0/10                        |

En la tabla 1, se observa que al realizar el ensayo de toxicidad aguda por vía oral en ratones mostró que los extracto evaluados posee un bajo potencial tóxico dado que los animales no llegaron a presentar convulsiones o incoordinación motora, no se detectó diarrea ni piloerección marcada, sin embargo se observa aumento marcado de la

actividad motora, erección de la cola y pilo erección en ambos casos y en la necropsia efectuada al término del estudio no se observaron alteraciones en el análisis macroscópico de las vísceras, hígado, bazo, riñón y pulmones de los animales.

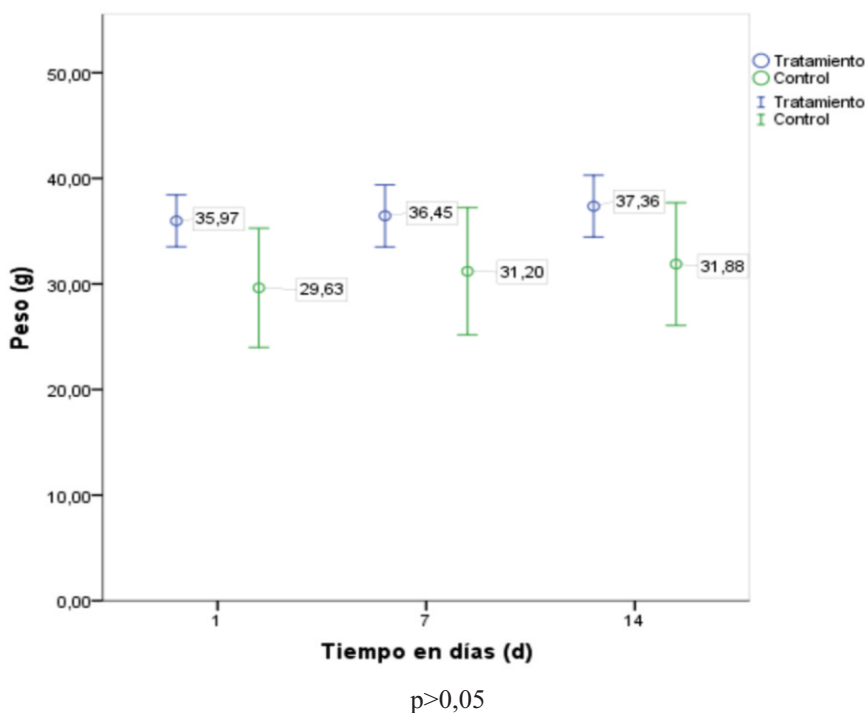


Figura 5. Variación de peso corporal de los ratones por efecto de la administración de 2000 mg/kg peso corporal del extracto hidroalcohólico de *Theobroma cacao* “cacao” variedad VRAEM15, Ayacucho 2018.

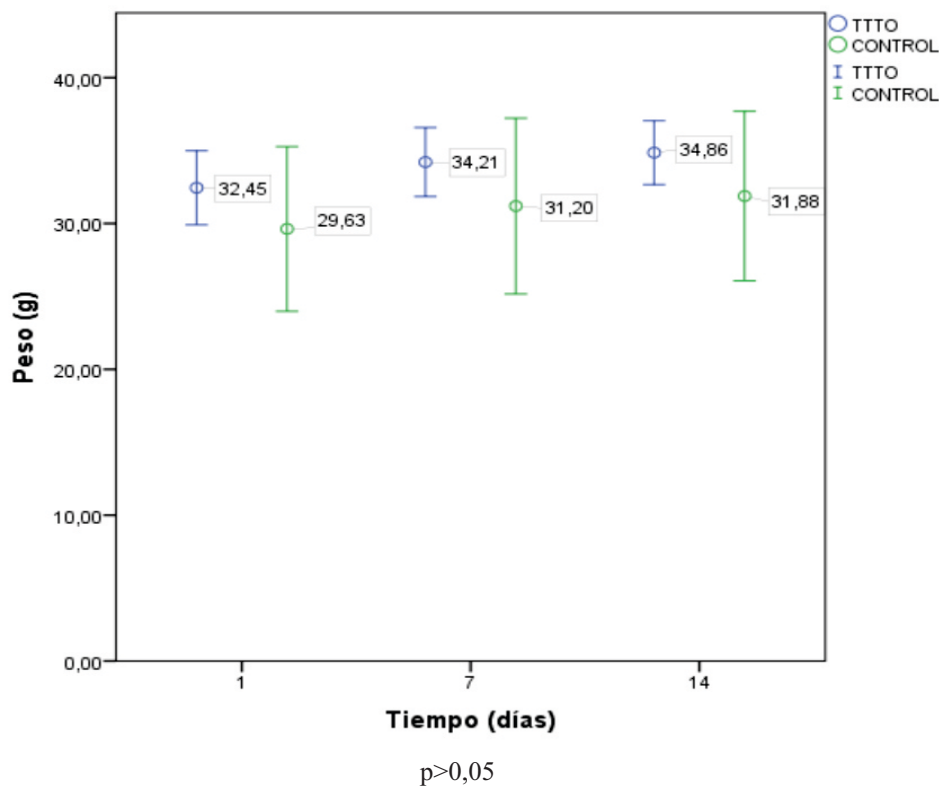


Figura 6. Variación de peso corporal de los ratones por efecto de la administración de 2000 mg/kg peso corporal del extracto hidroalcohólico de *Theobroma cacao* "cacao" variedad criollo, Ayacucho 2018.

En las figuras 5 y 6 se observan la variación de peso corporal de los ratones por efecto de la administración del extracto hidroalcohólico a 2000 mg/kg p.c., se aprecia ganancia peso corporal moderado, tanto del grupo tratamiento como del grupo control en función del tiempo, siendo estadísticamente no significativos según la prueba de ANOVA.

Los resultados de estudios de toxicidad aguda para el extracto en la presente investigación indican que, la Dosis letal 50 (DL50) estaría encima de los 2000 mg/kg de peso corporal, clasificándose en la categoría 5 según el Sistema Globalmente Armonizado<sup>16</sup>, calificándose como "No clasificadas".

**Tabla 2.** Porcentaje de micronúcleos en eritrocitos de ratón al administrar el extracto hidroalcohólico de *Theobroma cacao* de las variedades VAREM15 y criollo. Ayacucho 2018.

| Tratamiento                  | Media ± DS       | Media ± DS       |
|------------------------------|------------------|------------------|
|                              | Variedad VRAEM15 | Variedad criollo |
| Control (SSF)                | 1,167 ± 0,753    | 1,00 ± 0,632     |
| Ciclofosfamida 40 mg/kg (CP) | 8,833 ± 4,021 *  | 7,33 ± 3,141 *   |
| CP + EH 500 mg/kg            | 0,833 ± 0,753    | 0,667 ± 0,516    |
| CP + EH 1000 mg/kg           | 1,333 ± 0,516    | 0,833 ± 0,408    |

EH: extracto hidroalcohólico

\* p< 0,05

En la tabla 2 se describe el porcentaje de micronúcleos en eritrocitos de ratón, al administrar el extracto hidroalcohólico de las variedades VRAEM15 y criollo de las semillas de cacao, se observan que en ambos casos los grupos tratados no muestran variación significativa del porcentaje de micronúcleos en relación al grupo control (p> 0,05), lo cual nos señala que el cacao no causa daño en los cromosomas.

El ensayo in vivo de micronúcleos en mamíferos se emplea para detectar lesiones provocadas por la sustancia de ensayo

en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos mediante el análisis de eritrocitos tomados de la médula ósea y/o la sangre periférica de animales (por lo general roedores), por ende determina daño en los cromosomas en un sistema vivo. Tiene por objeto determinar las sustancias que ocasionan lesiones citogenéticas que dan lugar a la formación de micronúcleos con fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros retardados<sup>17</sup>.

Los micronúcleos son cuerpos citoplasmáticos de naturaleza nuclear, se corresponden con material genético no

incorporado correctamente a las células hijas durante la división celular, reflejan aberraciones cromosómicas y se originan por roturas cromosómicas, por errores durante la replicación y posterior división celular del ADN y/o por la exposición a agentes genotóxicos. Existen factores capaces de influir o modificar el número de micronúcleos presentes en una célula como edad, género, vitaminas, tratamientos médicos, exposición diaria a agentes genotóxicos, etc.<sup>18</sup>.

Siendo la genotoxicidad la capacidad relativa de un agente de ocasionar daño en el material genético, origina efectos biológicos adversos no solo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentren relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula<sup>19</sup>.

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos policromáticos, el núcleo principal es expulsado y el micronúcleo, caso de haberse formado, puede permanecer en el citoplasma, que de lo contrario quedaría anucleado. Resulta más fácil visualizar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos de animales tratados es indicativo de la existencia de lesiones cromosómicas inducidas<sup>18</sup>. La detección de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados en la sangre periférica también puede llevarse a cabo en otras especies en las que se haya demostrado que el bazo no es capaz de eliminar los eritrocitos micronucleados o que son suficientemente sensibles para detectar agentes que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Entre los diversos criterios para distinguir los micronúcleos figura la determinación de la presencia o la ausencia de centrómero o de ADN centromérico en los mismos. El parámetro principal es la frecuencia de eritrocitos inmaduros policromáticos micronucleados<sup>20</sup>.

Arroyo y col., 2018<sup>21</sup>, al evaluar el efecto antimutagénico del aceite de las semillas de *Plukenetia volubilis* “sacha inchi” en ratones encontró que no presenta efecto mutagénico al no inducir la formación de micronúcleos en sangre y médula ósea de ratón.

Con relación a la ausencia de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico se debe a que los componentes presentes no tienen efecto sobre los procesos hereditarios como reporta al evaluar el efecto genotóxico de los extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (llantén menor) y *Matricaria recutita* L. (manzanilla)<sup>22</sup>.

En conclusión, las semillas de *Theobroma cacao* L “cacao” tiene alto contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y buena actividad antioxidante y no presenta genotoxicidad por ensayo de micronúcleos en ratones.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- García L. Cultivares de Cacao del Perú. Lima, Perú. MINAGRI, DEVIDA (2014) Segunda Reimpresión, junio 2014. 108 p.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Calidad de Cacao en Centroamérica: Un vistazo a la situación en 2009. Turrialba, Costa Rica, 2012. 88 P.
- Gómez-Juaristi M, González-Torres L, Bravo L, Vaquero M, Bastida S, Sánchez-Muniz F. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutr Hosp.* 2011; 26(2):289-292.
- Siquet, C., Paiva, F., Reis, S., Borges, F. Antioxidant profile of dihydroxy-and trihydroxyphenolic acids-A structure-activity relationship study. *Free Radicla Research.* Portugal. 2006; 40 (4): 433-442.
- Sponchiado G, Adam M, Dadalt C, Silva B, Mello-Sampayo D, Almeida C, Januário C, Fleith m. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review, *Journal of Ethnopharmacology*, 2016; 178,289-296.
- Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
- Aguilar E. Estudio de los flavonoides aislados de las hojas de *Smilax sonchifolius* (yacón) y determinación de su actividad antioxidante e inmunomoduladora. [Tesis de Maestría]. UNMSM. 2007.
- Thangaraj P. Pharmacological Assays of Plant - Based Natural Products. Series:Progress in Drug Research 71. Editor: K.D. Rainsford. Springer 2016.
- Carciochi RA, M. G. D. K., 2014. Changes in phenolic composition and antioxidant activity during germination of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd). *International Food Research Journal*, 21(2), pp. 767 - 773.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 669-675.
- OECD. Organization for economic co-operation and development. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Test N° 423. 2001: 1-14.
- OECD. Organization for economic co-operation and development. Guideline for testing of chemicals. Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test N° 474 1997: 1-10.
- Arroyo J, Cisneros C. Modelos experimentales de investigación farmacológica. Asdimor publicaciones SAC. 2012: 139-140.
- Hernández R, Fernández C. Baptista P. Metodología de la investigación. 4a Ed. Editorial McGraw Gill Interamerica. México 2008.



15. Hii C.L., Law CL, Suzannah S, Misnawi, Cloke M. Polyphenol in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *As. J. Food Ag – Ind.* 2009, 2(4): 702 – 722.
16. SGA. Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos. 1ra ed. Naciones Unidas. Nueva York y Ginebra, 2005:115-291.
17. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales Sis San Navarra.* 2005, 28(2).
18. Marzin D. The position of the in vitro micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutat Res* 1997; 392: 175-181.
19. Holmberg B, Högberg J, Johanson G. Toxicología, Principios generales de la toxicología: Definiciones y conceptos In: Silbergeld E, editor. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo.* p. 2001. 33.3-.5.
20. Gollapudi B, McFadden L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. *Mutation Res* 2000; 354(2):97-99.
21. Arroyo-Acevedo J, Herrera-Calderón O, Cisneros-Hilario C, Chávez-Asmat R, Anampa-Guzmán A, Enciso-Roca E, Condorhuaman-Figueroa M, Pari-Olarte B. Antimutagenic effect of *Plukenetia volubilis* (Sacha inchi) Oil in BALB/c Mice. *Annual Research & Review in Biology.* 2018; 24(3):1-8.
22. Vizoso A, Ramos A, Villaescusa A, Décalo M, Betancourt J. Evaluación del efecto genotóxico en extractos fluidos de *Plantago lanceolata* L. (llantén menor) y *Matricaria recutita* L. (manzanilla). *Rev. Cubana Plant Med* 2000; 5 (2).