



POSGRADOS

MAESTRÍA EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NATURALES

RPC-SO-09-NO.174-2020

OPCIÓN DE TITULACIÓN:
TESIS

TEMA:

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS
BIOACTIVOS DE SEMILLAS DE
CUATRO VARIEDADES DE CACAO DE
LA AMAZONÍA

AUTOR(ES)

ANDRÉS IVÁN SALAZAR LOOR

DIRECTOR:

ELENA DEL ROCÍO COYAGO CRUZ

QUITO – ECUADOR
2025



Autor(es):



Andrés Iván Salazar Loor

Ingeniero Químico

Candidato a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

asalazarl4@est.ups.edu.ec

Dirigido por:



Elena Del Rocío Coyago Cruz

Ingeniera Química

Magister en Ingeniería Industrial y Productividad

Doctora (PhD) en Ingeniería Agraria, Alimentaria, Forestal y Del Desarrollo Rural Sostenible

ecoyagoc@ups.edu.ec

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos e investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS

2025 © Universidad Politécnica Salesiana.

QUITO– ECUADOR – SUDAMÉRICA

Andrés Iván Salazar Loor

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE SEMILLAS DE CUATRO VARIEDADES DE CACAO DE LA AMAZONÍA

DEDICATORIA

*A Dios todopoderoso sobre todas las cosas
Porque en su gracia todo lo puedo
Él es la luz que ilumina mi camino.
A mi amada esposa que es mi mejor amiga
que ha sido incondicional conmigo y
me ha impulsado a superarme siempre.
A mis Padres, mi hermano, mis suegros y
mis cuñadas que son seres de luz en mi vida,
dedico el presente trabajo con mucho cariño.*

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, que cada día me permite despertar con salud y con actitud para enfrentar todos los desafíos que se me presenten, incluido este camino de la maestría. Agradezco a mi esposa por ser mi compañera de vida, y que me ha ayudado día tras día a continuar esta investigación. Agradezco también a mis padres y a cada miembro de mi familia que me tendió la mano para mantenerme firme en el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana, a todos los docentes de la Maestría de Productos Farmacéuticos Naturales por ser grandes profesionales muy preparados y empáticos con los maestrantes. Extiendo un agradecimiento muy especial a la Dra. Elena Coyago, que con su carisma, sabiduría y experiencia en investigación me ha permitido concluir el presente trabajo de titulación con su excelsa guía.

Agradezco a Aidita que compartió cada conocimiento del laboratorio con mi persona y a todos los tesisistas de pregrado de la carrera de Biotecnología que de manera directa e indirecta brindaron su valiosa ayuda como soporte en la presente investigación.

TABLA DE CONTENIDO

1.	Introducción	10
2.	Determinación del Problema.....	12
3.	Marco teórico referencial.....	14
3.1.	Propiedades fisicoquímicas de las frutas.....	14
3.1.1.	Calidad comercial de las frutas	15
3.2.	Compuestos bioactivos de las frutas	16
3.2.1.	Carotenoides.....	16
3.2.2.	Compuestos fenólicos.....	19
3.3.	Actividad antioxidante de las frutas	22
3.3.1.	Métodos de cuantificación de la actividad antioxidante.....	23
3.4.	<i>Theobroma</i>	26
3.4.1.	Especies del género <i>Theobroma</i>	27
3.4.2.	<i>Theobroma subincanum</i>	28
3.4.3.	<i>Theobroma speciosum</i>	29
3.4.4.	<i>Theobroma bicolor</i>	29
3.4.5.	<i>Herrania nitida</i>	30
3.4.6.	<i>Theobroma cacao</i> L.....	30
3.4.7.	Compuestos bioactivos en los frutos de <i>Theobroma cacao</i> L.	31
4.	Materiales y metodología.....	34
4.1.	Muestreo.....	34
4.2.	Cuantificación fisicoquímica	34
4.3.	Cuantificación de compuestos bioactivos	37
4.3.1.	Carotenoides totales.....	37
4.3.2.	Compuestos fenólicos totales.....	39
4.4.	Cuantificación de la actividad antioxidante.....	41
4.5.	Análisis estadístico	43
5.	Resultados y discusión.....	44
5.1.	Cuantificación fisicoquímica	44
5.2.	Cuantificación de compuestos bioactivos	50
5.2.1.	Carotenoides totales.....	50
5.2.2.	Fenoles totales	51
5.3.	Cuantificación de la actividad antioxidante.....	53
6.	Conclusiones.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los principales métodos analíticos para cuantificación de actividad antioxidante.	24
Tabla 2. Compuestos químicos presentes en distintas partes de los frutos de cacao... ..	32
Tabla 3. Compuestos fenólicos en distintas partes del fruto de cacao.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplos de carotenos y xantofilas	17
Figura 2. Biosíntesis de carotenoides en plantas a través de la ruta del metileritrol fosfato (MEP).....	18
Figura 3. Principales subgrupos de compuestos fenólicos.....	20
Figura 4. Mecanismo de biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de la ruta del ácido shikimico	21
Figura 5. Esquema de generación del anión superóxido a partir del oxígeno molecular, a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial.....	23
Figura 6. Reacción del radical DPPH· en presencia de antioxidantes	25
Figura 7. Reacción del radical ABTS· en presencia de antioxidantes	26
Figura 8. Distribución geográfica del género <i>Theobroma</i>	26
Figura 9. Representación gráfica de los frutos las especies del género <i>Theobroma</i>	27
Figura 10. Fotografías de fruto y semillas de a) <i>T. cacao</i> ; b) <i>T. bicolor</i> y c) <i>T. grandiflorum</i>	28
Figura 11. Inflorescencia, frutos y semillas de <i>T. speciosum</i>	29
Figura 12. Frutos e inflorescencias de <i>H. nitida</i>	30
Figura 13. Partes del fruto de <i>Theobroma cacao</i>	31
Figura 14. Valores promedio de peso de los frutos y las semillas de las cuatro especies de cacao en estudio.....	45
Figura 15. Valores promedio del diámetro ecuatorial y longitudinal de las cuatro especies de cacao en estudio.	47
Figura 16. Valores promedio pH, sólidos solubles, % acidez titulable, % humedad y cenizas de las cuatro especies de cacao en estudio.....	49
Figura 17. Valores promedio de carotenoides totales presentes en las cuatro especies de cacao en estudio.....	51
Figura 18. Valores promedio de compuestos fenólicos totales presentes en las cuatro especies de cacao en estudio	52
Figura 19. Resultados medios de actividad antioxidante in vitro por método ABTS para las cuatro especies de cacao en la Amazonía ecuatoriana	54

EVALUACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE SEMILLAS DE CUATRO VARIETADES DE CACAO DE LA AMAZONÍA

AUTOR(ES):

ANDRÉS IVÁN SALAZAR LOOR

RESUMEN

Theobroma es un género de familia *Malvaceae*, con diversas especies nativas de la región amazónica, incluido Ecuador. Las semillas de este género se emplean principalmente en la producción de chocolate; sin embargo, su valor trasciende el uso alimenticio debido a sus propiedades terapéuticas con potenciales beneficios para la salud. En este contexto, el objetivo de esta investigación fue evaluar los compuestos bioactivos de las semillas de cuatro especies de cacao amazónico *Theobroma subincanum*, *Theobroma speciosum*, *Theobroma bicolor* y *Herrania nitida*. Se analizaron las propiedades fisicoquímicas del fruto, las cuales incluyeron el peso del fruto y las semillas, el diámetro ecuatorial, longitudinal, pH, sólidos solubles, acidez titulable, humedad y cenizas. Además, se cuantificaron los carotenoides totales y los compuestos fenólicos totales mediante espectrofotometría en microplacas. La actividad antioxidante se determinó utilizando el método ABTS. Los resultados mostraron altos valores de peso del fruto (2066,67 g) y de semillas (5,38 g) en *T. bicolor*, diámetro ecuatorial en *T. subincanum* (65,11 mm), diámetro longitudinal en *H. nitida* (93,34 mm), pH en *T. bicolor* (6,70), sólidos solubles en *H. nitida* (12,00 °Brix), acidez titulable *T. subincanum* (1,72 %), humedad *T. bicolor* (92,71%), ceniza *H. nitida* (2,63%). A su vez, se presentó altas concentraciones de carotenoides totales en *T. subincanum* (600,43 µg/g PS) y compuestos fenólicos totales en *H. nitida* (731,33 mg/100 g PS). Además, la mayor actividad antioxidante se presentó en *T. speciosum* (5,67 mM Trolox/100 g PS). De esta manera este estudio contribuye al conocimiento de las propiedades bioactivas y fisicoquímicas de estas especies amazónicas de cacao, las cuales presentan un notable potencial para el desarrollo de productos con beneficios para la salud.

Palabras clave: Actividad antioxidante, alimentos funcionales, Carotenoides, Fenoles

ABSTRACT

Theobroma is a genus of the *Malvaceae* family, with several species native to the Amazon region, including Ecuador. The seeds of this genus are mainly used in the production of chocolate; however, their value goes beyond food use due to their therapeutic properties with potential health benefits. In this context, the objective of this research was to evaluate the bioactive compounds of the seeds of four Amazonian cacao species, *Theobroma subincanum*, *Theobroma speciosum*, *Theobroma bicolor* and *Herrania nitida*. The physicochemical properties of the fruit were analyzed, including fruit and seed weight, equatorial diameter, longitudinal diameter, pH, soluble solids, titratable acidity, moisture and ash. In addition, total carotenoids and total phenolic compounds were quantified by microplate spectrophotometry. Antioxidant activity was determined by the ABTS method. The results showed high values for fruit weight (2066.67 g) and seed weight (5.38 g) in *T. bicolor*, equatorial diameter in *T. subincanum* (65.11 mm), longitudinal diameter in *H. nitida* (93.34 mm), pH in *T. bicolor* (6.70), soluble solids in *H. nitida* (12.00 °Brix), titratable acidity in *T. subincanum* (1.72%), moisture in *T. bicolor* (92.71%), ash in *H. nitida* (2.63%). At the same time, high concentrations of total carotenoids were found in *T. subincanum* (600.43 µg/g PS) and total phenolic compounds in *H. nitida* (731.33 mg/100 g PS). Furthermore, the highest antioxidant activity was found in *T. speciosum* (5.67 mM Trolox/100 g PS). Thus, this study contributes to the knowledge of the bioactive and physicochemical properties of these Amazonian cocoa species, which have a remarkable potential for developing products with health benefits.

Keywords: Antioxidant activity, functional food, carotenoids, phenolics

1. INTRODUCCIÓN

El nombre *Theobroma* proviene del griego y significa “alimento de los Dioses” (Lanaud et al., 2024). Los representantes de este género son conocidos comúnmente como cacao (WFO, 2024), aunque taxonómicamente, esta denominación se aplica específicamente a la especie *Theobroma cacao* L. (Tropicos.org, 2024a). Dentro de esta especie se reconocen tres genotipos principales que son el criollo, forastero y trinitario (un híbrido de los dos primeros). Estas variedades fueron cultivadas por culturas como los Mayas y los Aztecas, quienes usaron el cacao desde aproximadamente el año 600 antes de Cristo (Singh et al., 2020).

La actividad antioxidante de los genotipos de *Theobroma spp.* ha sido vinculada con su origen genético y grado de domesticación (Avendaño et al., 2021). En Colombia, los genotipos UTGC01 y CCN51 demostraron mayor actividad antioxidante en comparación con otros cultivados en Tolima (Borja et al., 2022). En Perú, estudios en híbridos de Criollo y CCN 51 señalaron un alto contenido de polifenoles (Murillo et al., 2020). En Ecuador, los genotipos CCN-51, EEB-8 e ICS-95 se destacan por su contenido en compuestos bioactivos con efectos benéficos para la salud (Toaquiza, 2022). Sin embargo, durante el procesamiento del cacao en chocolate se reduce la concentración de compuestos fenólicos (Santacruz & Mantuano, 2021).

Adicional del *Theobroma cacao* tradicional, existen otras especies y subespecies del género con nombres vernáculos similares. Por ejemplo, *Theobroma bicolor*, conocido como cacao blanco o pataxte (chocante.pl, 2024), y *Theobroma grandiflorum*, llamado copoazú o cacau en Brasil y Colombia (Montero et al., 2024). También se incluyen especies relacionadas como *Herrania nitida*, conocida en español como cacao de monte (Pérez et al., 2019). Estas variedades contienen compuestos bioactivos; por ejemplo, *T. grandiflorum* presenta ácidos grasos y compuestos fenólicos que disminuyen los niveles de triglicéridos en ensayos *in vivo*,

Mientras que las semillas de *T. bicolor* han mostrado propiedades antiproliferativas frente a células cancerosas (Febrianto & Zhu, 2022).

Las semillas de estas especies son ricas en compuestos bioactivos, que ofrecen beneficios como la mejora de la salud cardiovascular, propiedades anticancerígenas y actividad neuroprotectora. Entre los compuestos principales se encuentran esteroides, tocoferoles, ácidos grasos (Cerri et al., 2019), flavonoides como catequinas y epicatequinas, metilxantinas como teobromina y cafeína, y polifenoles con una destacada actividad antioxidante (Edo et al., 2023).

A pesar del creciente interés en el potencial antioxidante de estos compuestos, aún se ha explorado poco sobre la actividad antioxidante de especies de cacao amazónico ecuatoriano, especialmente aquellas distintas a *Theobroma cacao* y sus genotipos más conocidos. En este sentido, la presente investigación tiene como objetivo caracterizar las propiedades fisicoquímicas (pH, sólidos solubles, humedad, contenido de cenizas, y acidez titulable) y cuantificar los compuestos bioactivos (carotenoides y fenoles) mediante métodos espectrofotométricos. Asimismo, se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* utilizando la metodología ABTS. El estudio se enfocó en las semillas de cuatro especies de cacao recolectadas en la Napo, Ecuador. De esta manera, se busca destacar los beneficios de estas especies locales como potenciales productos farmacéuticos naturales con actividad biológica favorable para la salud humana.

2. DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

El género *Theobroma* incluye entre 21 y 29 especies según diferentes clasificaciones taxonómicas (POWO, 2024; WFO, 2024), siendo *Theobroma cacao* L. la más representativa por el uso de sus semillas en la elaboración de chocolate. Todas las especies de este género se encuentran distribuidas en la región tropical del continente americano, y varias de ellas han sido registradas en Ecuador, especialmente en las regiones Costa y Amazonía (De Abreu et al., 2023).

En la Amazonía ecuatoriana, se destacan especies como *T. subincanum* Mart. con 241 ejemplares (36% del total); *T. bicolor*, con 34 ejemplares (35%); *T. speciosum*, con 35 ejemplares (23%) y *T. glaucum* con 21 ejemplares (22%). Además, se ha documentado la presencia de *T. grandiflorum* y una subespecie conocida como *sphaerocarpum* en las provincias orientales de Ecuador. Aunque no se han reportado especímenes de *T. sylvestre* en el país, se sospecha su existencia debido a registros georreferenciados en la Amazonía sudamericana. Por otra parte, *Herrania nitida* (Poepp.) R.E. Schult, también conocida como *Theobroma asperum* (H. Karst. & Triana), cuenta con 56 ejemplares (37% del total), lo que confirma la amplia diversidad del género *Theobroma* en la selva ecuatoriana (Tropicos.org, 2024b).

La búsqueda de productos farmacéuticos naturales con actividad biológicas es un área de creciente interés, dadas las ventajas que estos pueden ofrecer para la salud humana. Tradicionalmente, el cacao ha sido apreciado principalmente por el chocolate que se elabora a partir de sus semillas. Sin embargo, en las últimas décadas ha ganado reconocimiento por sus beneficios para la salud, incluyendo efectos como estimulante cognitivo, antidiabético, antioxidante y cardioprotector. Entre los compuestos bioactivos más relevantes se encuentran los flavonoides, que abarcan flavanoles, procianidinas y antocianinas (Quiroz & Aguilar, 2022).

Aunque la investigación sobre *Theobroma cacao* ha avanzado significativamente, pocas investigaciones han explorado las propiedades de las especies amazónicas ecuatorianas. Por ejemplo, Yanzapanta (2014) estudió el contenido de polifenoles totales en almendras de cacao de tres zonas productoras específicas de la Amazonía ecuatoriana (Orellana, Sucumbíos y Napo). El estudio reportó concentraciones de polifenoles de entre 40,0 y 70,0 mg EAG/ g de cacao desgrasado, sin precisar el genotipo predominante en cada zona. Esto refleja la necesidad de profundizar en investigaciones que no solo determinen la concentración de compuestos bioactivos, sino que también vinculen estos contenidos con las especies específicas de cacao estudiadas, considerando su actividad antioxidante.

Con este antecedente, resulta de interés investigar las especies de cacao nativas de la Amazonía ecuatoriana, con el objetivo de identificar y evaluar su potencial bioactivo. Si bien los beneficios para la salud de *Theobroma cacao* y su derivado, el chocolate, están ampliamente documentados, se ha descuidado el estudio de cacaos más silvestres del género. La presente investigación busca llenar este vacío, evaluando el contenido de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de semillas de cuatro especies amazónicas.

3. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LAS FRUTAS

Las propiedades físicas y químicas de las frutas y verduras suelen estar estrechamente relacionadas. Por ejemplo, en los tomates, el color, una propiedad física, refleja su contenido de carotenoides, una característica química (Nambi et al., 2024). De forma similar, en los frutos cítricos, la calidad depende tanto de propiedades físicas externas como el tamaño, peso, forma y color, así como de características químicas internas, entre las que se encuentran los sólidos solubles totales, ácidos, vitaminas y carotenoides. Los terpenoides y flavonoides presentes en estos frutos también contribuyen a su sabor amargo (Salto et al., 2024).

El procesamiento para la comercialización de frutas puede modificar tanto sus características físicas como químicas. Durante el secado, por ejemplo, el color se degrada debido a procesos enzimáticos y no enzimáticos, mientras que la pérdida de agua intensifica los colores predominantes y afecta las propiedades estructurales y mecánicas. La exposición al oxígeno también puede ocasionar la oxidación o degradación térmica de vitaminas, minerales, azúcares, compuestos fenólicos y carotenoides (Ismail & Gögüs, 2023).

Las propiedades sensoriales, como la textura, el sabor y el aroma, se ven afectadas por la composición química. La textura es un indicador de frescura y depende de la cantidad de agua y fibra presente. El color varía según el estado de maduración, desde tonalidades verdes, asociadas a la clorofila, hasta amarillos, naranjas y rojos provocados por los carotenoides y compuestos fenólicos. En frutas de tonos púrpuras, azules y morados predominan las antocianinas. Durante la maduración, la textura se ablanda, el sabor se endulza y el aroma se intensifica, reflejando cambios en su composición química. Las frutas contienen entre un 75% y un 90% de

agua y entre un 5 y 18% de azúcares, principalmente en forma de monosacáridos (fructosa y glucosa) y disacáridos como la sacarosa. Estos carbohidratos sencillos son responsables del sabor dulce característico. Algunas frutas también contienen sorbitol, un azúcar con efecto laxante. Sin embargo, su contenido en proteínas y ácidos grasos es generalmente bajo, con valores inferiores al 1,5% y 0,5%, respectivamente. Los ácidos grasos, como el palmítico, oleico y linoleico, se presentan en forma de cera que recubre la piel de algunas frutas, actuando como protección frente a agentes bióticos y abióticos. Además, las frutas contienen ácidos orgánicos, como el ácido cítrico en naranjas y limones y el ácido málico en uvas y manzanas, los cuales influyen en su acidez y astringencia. Su composición puede variar en función de la luz solar recibida, afectando la concentración de vitaminas (A, C y del complejo B) y minerales como sodio, potasio, calcio y magnesio (Albrecht et al., 2019).

3.1.1. CALIDAD COMERCIAL DE LAS FRUTAS

Las frutas, por ser alimentos perecederos, requieren atención especial para garantizar su calidad y seguridad durante la cosecha, transporte y procesamiento, evitando su deterioro. Dadas su alta demanda a nivel mundial, es importante mantener estándares que preserven su valor nutricional (propiedades químicas), sus atributos sensoriales (propiedades físicas) y su inocuidad.

En este contexto, existe normativas a nivel nacional e internacional que regulan ciertos aspectos relacionados con las frutas. El cumplimiento de estas normativas permite ofrecer productos de alta calidad a los consumidores, asegurando tanto la conservación de las propiedades nutricionales como el cumplimiento de los estándares de seguridad alimentaria. Así, en Ecuador, el Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) establece normativas para asegurar la calidad de las frutas en el mercado local. Entre estas, destacan las normas NTE INEN 1751:2012, que define y clasifica las frutas frescas; NTE INEN 1750:1994, que describe los procedimientos para el muestreo de frutas y hortalizas; y NTE INEN 2337:2008, que especifica los requisitos para jugos, pulpas, concentrados, néctares y bebidas de frutas y

vegetales. Además, normativas como NTE INEN-ISO 1842:2013, NTE INEN-ISO 750:2013 y NTE INEN-ISO 2173:2013 que establecen los procedimientos para determinación de pH, acidez titulable y sólidos solubles, respectivamente. A nivel internacional, la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) regula la calidad mediante normativas como la ISO 874:1998, que define los procedimientos de muestreo para frutas y verduras frescas. Las normativas nacionales INEN-ISO se adaptan a partir de estas regulaciones internacionales para garantizar la coherencia entre los estándares locales y globales (ISO-874:1998, 1998; NTE-INEN-1750, 2012; NTE-INEN-1751:96, 2012; NTE-INEN-ISO-2173:2013, 2013; NTE-INEN-ISO-750:2013, 2013; NTE INEN 2337, 2008; Villacís, 2022).

3.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LAS FRUTAS

Las frutas representan una importante fuente de compuestos bioactivos, especialmente metabolitos secundarios que resultan de las interacciones bióticas y abióticas en las plantas. Entre estos metabolitos secundarios de las plantas destacan los carotenoides y compuestos fenólicos, reconocidos por su potente actividad antioxidante y su capacidad para mitigar enfermedades crónicas (Munekata et al., 2023).

3.2.1. CAROTENOIDES

Los carotenoides son compuestos químicos responsables de la coloración que varía entre el amarillo y el rojo en organismos fotosíntesis, incluidas las plantas. Estos se localizan en los cloroplastos de tejidos verdes como hojas, semillas y frutas, donde se asocian a la clorofila para absorber energía lumínica en longitudes de onda específicas. Además, protegen las células vegetales contra radicales libres y daños foto oxidativos. Dado que la mayoría de los animales no pueden sintetizarlos, los carotenoides deben ser obtenidos a través de la dieta mediante el consumo de frutas y verduras. Su ingesta ha demostrado beneficios para la salud, incluyendo

efectos cardioprotectores y anticancerígenos, así como mejoras en la salud ósea (Crupi et al., 2023).

Desde el punto de vista químico, los carotenoides son tetraterpenos, compuestos por ocho unidades de isopreno, con una estructura central de 40 átomos de carbono. Generalmente su estructura contiene una cadena de polieno con nueve dobles enlaces y en los extremos poseen estructuras específicas. Los carotenoides se dividen en carotenos (hidrocarburos) y xantofilas (que contienen oxígeno en forma de grupos hidroxilo, carbonilo, entre otros) (Maoka, 2020). Es así, como en la figura 1 se muestran algunos ejemplos de carotenos y xantofilas con su estructura química característica.

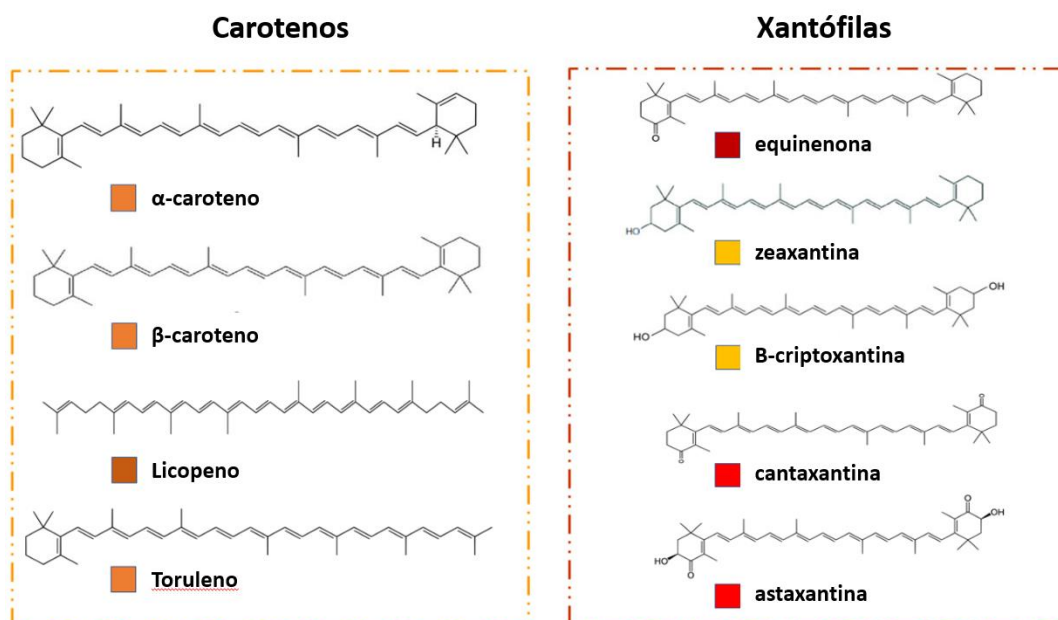


Figura 1. Ejemplos de carotenos y xantofilas

Fuente: (Naz et al., 2023)

En este contexto, la síntesis de carotenoides en las plantas ocurre en los plastos mediante la ruta del metileritrol fosfato (MEP) (Figura 2). Esta comienza con la condensación del pirofosfato de isopentenilo (IPP) con dimetilalil-pirofosfato (DMAPP), seguido de formación del geranil geranil pirofosfato (GGPP), precursor de varios isoprenoides. La condensación de dos moléculas de GGPP da lugar al primer carotenoide y mediante desaturaciones e isomerizaciones se produce el licopeno,

precursor de carotenoides cíclicos como el α -caroteno y el β -caroteno. Las xantófilas se generan a partir de la hidroxilación de los anillos β ϵ . Estos compuestos también desempeñan funciones en la respuesta al estrés biótico y abiótico, además de actuar como repelente (Stra et al., 2023).

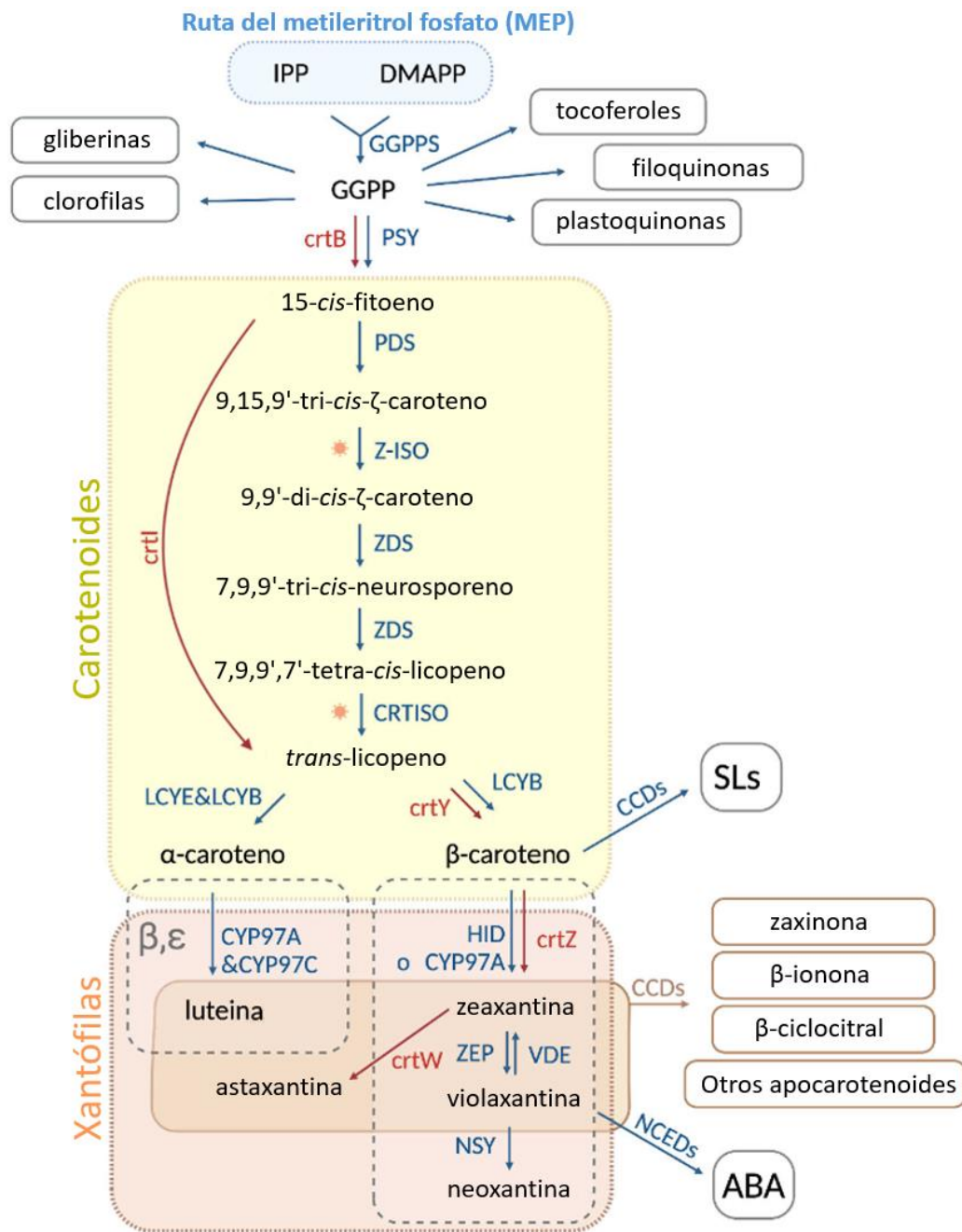


Figura 2. Biosíntesis de carotenoides en plantas a través de la ruta del metileritrol fosfato (MEP)

Fuente: (Stra et al., 2023)

Por otra parte, la cuantificación de carotenoides se realiza mediante espectrofotometría UV-visible, midiendo las absorbancias a diferentes longitudes de onda. Además, se utilizan técnicas avanzadas como la cromatografía líquida de alto resolución (HPLC por sus siglas en inglés: High Performance Liquid Chromatography) y espectroscopía de infrarrojo cercano y medio (FTIR por sus siglas en inglés Fourier Transform infrared spectroscopy) para identificar y cuantificar estos compuestos. La selección del método depende de la precisión requerida, la matriz analizada y la complejidad de la muestra (Hagos et al., 2022).

3.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos, otro grupo relevante de metabolitos secundarios, contribuyen tanto al sabor como a la calidad nutricional de las frutas, además de ofrecer beneficios para la salud mediante la reducción del estrés oxidativo (Kolap et al., 2022). Estos metabolitos actúan como antioxidantes al donar electrones o formar complejos con metales, protegiendo al organismo contra los radicales libres (Jia et al., 2024).

Los fenoles abarcan varias categorías, entre ellas flavonoides, ácidos fenólicos, y estilbenos, clasificados según su configuración estructural y número de átomos de carbono (Chen et al., 2021). Químicamente, un compuesto fenólico consiste en un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo. Se conocen alrededor de 8000 compuestos. En las plantas, estos compuestos cumplen funciones defensivas contra la radiación ultravioleta y patógenos, además de contribuir al color y sabor de los frutos. En este contexto los compuestos fenólicos se pueden clasificar en (Figura 3):

- Ácidos fenólicos: incluyen derivados del ácido benzoico (como el ácido gálico) y del ácido cinámico (como los ácidos cumárico y ferúlico).
- Flavonoides: con una estructura $C_6-C_3-C_6$, se divide en flavonas, flavanonas, flavonoles, antocianinas e isoflavonas. Ejemplos comunes son la quercetina y la catequina.

- Taninos: se agrupan en taninos hidrolizables y condensados, estos últimos conocidos como proantocianidinas.
- Estilbenos: El resveratrol es un estilbeno conocido por sus propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias y cardio-protectoras (Alara et al., 2021)

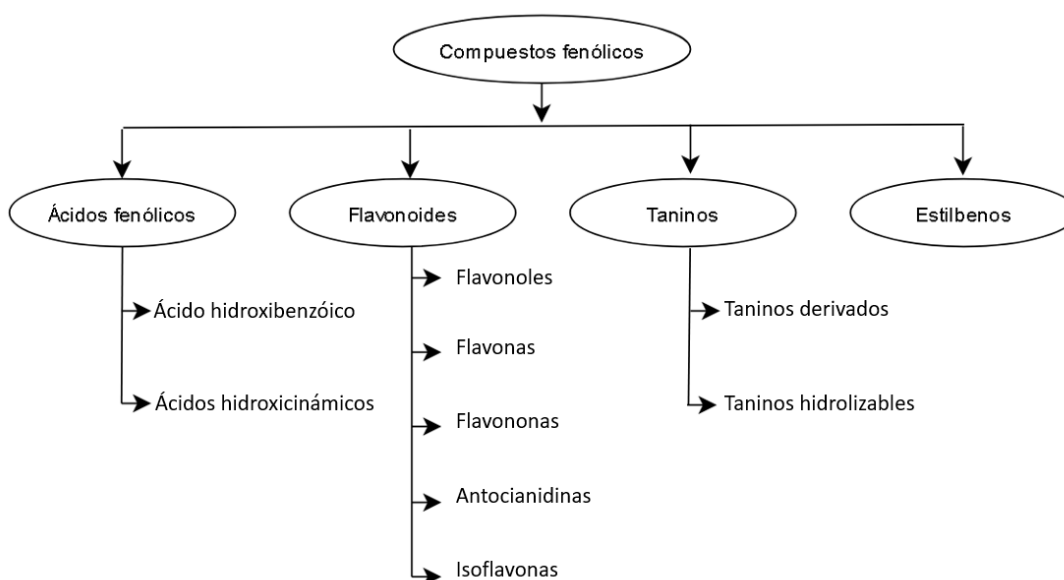


Figura 3. Principales subgrupos de compuestos fenólicos

Fuente: (Alara et al., 2021)

En este sentido, la ruta del ácido shikímico es el principal mecanismo de biosíntesis de los compuestos fenólicos (Figura 4). A partir del ácido shikímico, se genera fenilalanina, que pierde su grupo amino para formar ácido cinámico, precursor de múltiples fenoles como las cumarinas, chalconas y estilbenos (Semmar, 2024).

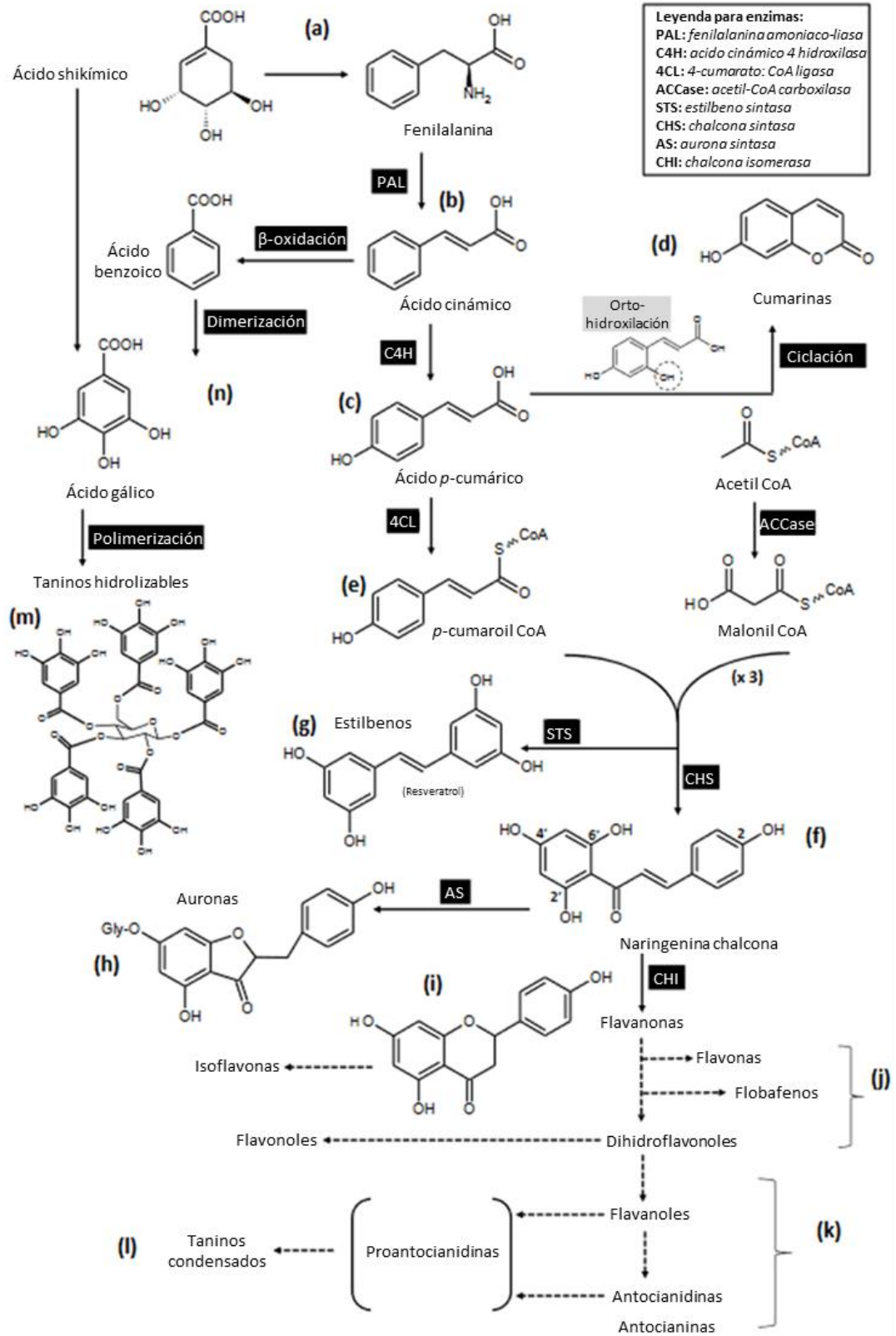


Figura 4. Mecanismo de biosíntesis de compuestos fenólicos a partir de la ruta del ácido shikímico

Fuente: (Semmar, 2024)

Por otra parte, la extracción de compuestos fenólicos puede realizarse mediante métodos tradicionales como Soxhlet, infusión o maceración. Sin embargo, estos procedimientos requieren altas cantidades de solventes y energía, además de ser susceptibles a la degradación de los compuestos. En la actualidad, se promueven extracciones verdes, como la extracción asistida por ultrasonido, que reduce el uso de solventes y optimiza la eficacia (Kolap et al., 2022).

Para la cuantificación de fenoles totales, el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu es el más utilizado por su precisión y eficiencia. No obstante, se están explorando alternativas más sostenibles, como el uso de cámaras digitales para evaluar cambios colorimétricos sin necesidad de equipos especializados (Lucas et al., 2022). Asimismo, técnicas avanzadas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) se emplean para identificar y cuantificar compuestos fenólicos en diversas matrices. Estas técnicas permiten obtener información estructural detallada y ofrecen alta sensibilidad, aunque su implementación requiere equipos costosos (Zhang et al., 2022).

3.3. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LAS FRUTAS

Los radicales libres son moléculas con un electrón no apareado en su último orbital, lo que las hace altamente reactivas. Pueden reaccionar con lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, causando daño celular. Además de las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés para reactive oxygen species), existen también radicales reactivos de nitrógeno y azufre. En el cuerpo humano, de acuerdo a la figura 5, los ROS se producen principalmente en la cadena transportadora de electrones mitocondrial durante la respiración celular, donde el oxígeno molecular se reduce para formar aniones superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Guija & Guija, 2023).

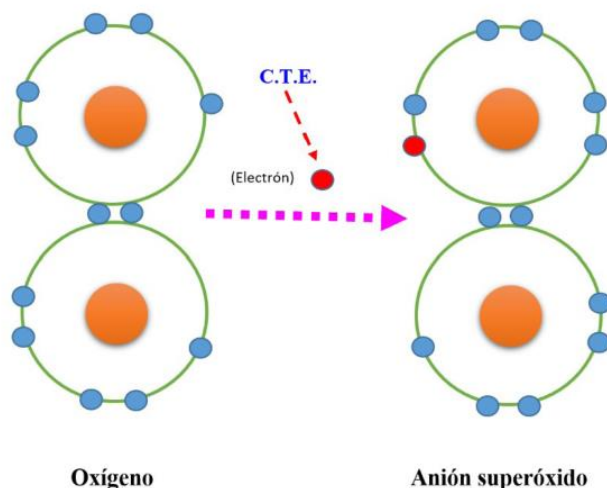


Figura 5. Esquema de generación del anión superóxido a partir del oxígeno molecular, a través de la cadena transportadora de electrones mitocondrial

Fuente: (Guija & Guija, 2023)

En este contexto, el estrés oxidativo se genera cuando hay un desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante del organismo para neutralizarlos. Este proceso es un factor clave en el desarrollo de enfermedades crónicas como cáncer, trastornos neurológicos, enfermedades cardiovasculares y diabetes (Siddeeg et al., 2021).

Por otra parte, las frutas constituyen una importante fuente de antioxidantes naturales que el organismo humano incorpora a través de la dieta. Entre estos antioxidantes destacan las vitaminas, los compuestos fenólicos y los carotenoides, junto con otros metabolitos endógenos (Ravimannan & Nisansala, 2017). Además, los polisacáridos presentes en las frutas también exhiben actividad antioxidante (Mohanta et al., 2023).

3.3.1. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Existe múltiples métodos para evaluar la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno desde antioxidantes hacia los radicales libres. Para que un método sea

aplicable a la evaluación *in vivo*, debe cumplir criterios específicos tales como usar radicales de origen biológico, ser sencillo y reproducible, y permitir la medición de antioxidantes tanto hidrofóbicos como hidrofílicos (Munteanu & Apetrei, 2021). Es así como en la Tabla 1 se muestra la categorización macro y meso de los métodos de cuantificación de actividad antioxidante.

Tabla 1. Resumen de los principales métodos analíticos para cuantificación de actividad antioxidante.

Técnica	Ensayo de actividad antioxidante	Principio del método	Determinación del producto final
Espectrometría	ORAC	Reacción antioxidante con radicales peroxilo, inducida por 2,2'-azobis-amidino-propano (AAPH)	Pérdida de fluorescencia de fluoresceína
	HORAC	Capacidad antioxidante para extinguir los radicales OH generados por un sistema tipo Fenton basado en Cobalto (II)	Pérdida de fluorescencia de fluoresceína
	TRAP	capacidad antioxidante para eliminar los radicales derivados del luminol, generados a partir de la descomposición de AAPH	Extinción de quimioluminiscencia
	CUPRAC	Reducción de Cobre (II) a (I) por acción de antioxidantes	Colorimetría
	FRAP	Reacción antioxidante con un complejo de hierro (III)	Colorimetría
	PFRAP	Reducción de ferrocianuro de potasio por acción de antioxidantes y reacción subsiguiente de ferrocianuro de potasio con ion Fe ³⁺	Colorimetría
	ABTS	Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico	Colorimetría
	DPPH	Reacción antioxidante con un radical catiónico orgánico	Colorimetría
	Análisis fluorométrico	Emisión de luz por un compuesto que ha absorbido luz u otra radiación electromagnética de una longitud de onda diferente.	Registro de espectros de excitación/emisión de fluorescencia.
Electroquímica	Voltimetría	Reducción u oxidación de un compuesto en la superficie de un electrodo de prueba, a un potencial aplicado apropiadamente, resultado en el transporte de masa de un nuevo material hacia la superficie del electrodo y en la generación de una corriente	Medición de la corriente en el pico catódico / anódico
	Amperometría	Potencial de un electrodo de prueba que es fijado a un valor con respecto al electrodo de referencia	Medición de la corriente generada por la oxidación / reducción de un analito electroactivo

Técnica	Ensayo de actividad antioxidante	Principio del método	Determinación del producto final
	Biamperometría	La reacción de un antioxidante con la forma oxidada de un par indicador reversible tipo REDOX	Medición de la corriente fluyendo a través de dos electrodos de trabajo idénticos, a una diferencia de potencial pequeña, y sumergidos en una solución que contiene la muestra analizada y un par reversible tipo REDOX
Cromatografía	Cromatografía de gases (GC)	La separación de los compuestos en una mezcla se basa en la repartición entre una fase estacionaria líquida y una fase móvil líquida	Detección mediante ionización de flama o conductividad térmica
	Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)	La separación de los compuestos en una mezcla se basa en la repartición entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida con diferentes polaridades, a una alta velocidad de flujo y presión de la fase móvil	Detección UV-VIS (como arreglo de diodos), detección fluorométrica, espectrometría de masas, o detección electroquímica

Fuente: (Munteanu & Apetrei, 2021)

En este contexto, entre los métodos más empleados se encuentra el ensayo DPPH (Figura 6), basado en el radical 2,2-difenil-1-picrihidrazilo, que presenta inicialmente un color violeta. Al reaccionar con antioxidantes, el radical se neutraliza y adquiere una tonalidad amarilla, cuyo cambio de color se mide a 517 nm en espectrofotometría. Los resultados se expresan como equivalentes de TROLOX, un estándar antioxidante. De manera similar, el ensayo ABTS mide la capacidad de los antioxidantes para reducir el radical catiónico ABTS^{•+}, el cual tiene un color azul verdoso con un pico de absorción a 734 nm (Figura 7). Al reaccionar con antioxidantes, la intensidad del color disminuye, permitiendo su cuantificación. Este método también utiliza TROLOX como estándar de referencia (Mejía-Reyes et al., 2022).

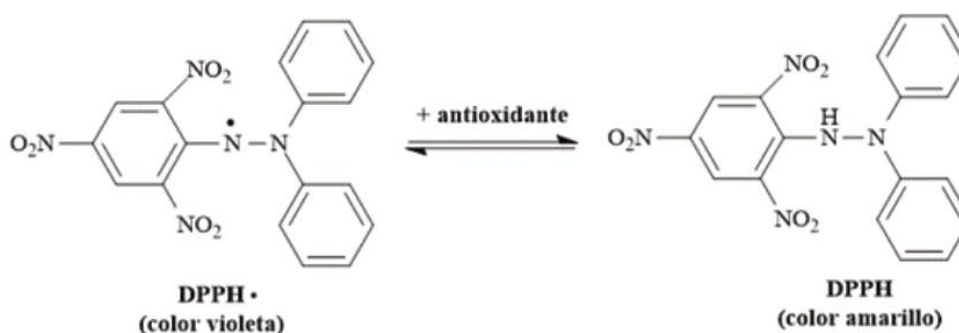


Figura 6. Reacción del radical DPPH[•] en presencia de antioxidantes

Fuente: (Mejía-Reyes et al., 2022)

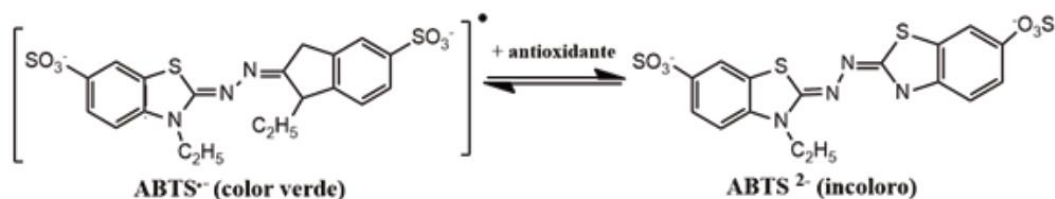


Figura 7. Reacción del radical ABTS^{•+} en presencia de antioxidantes

Fuente: (Mejía-Reyes et al., 2022)

3.4. *THEOBROMA*

La selva amazónica, una de las regiones más biodiversas del planeta, alberga un vasto número de especies vegetales con importantes propiedades medicinales. Entre ellas destaca la familia Malvaceae, que incluye 246 géneros y más de 4225 especies distribuidas en todo el mundo (Figura 8). Dentro de esta familia se encuentra el género *Theobroma*, compuesto por aproximadamente 20 especies, de las cuales nueve son nativas de la Amazonía. Los frutos de *Theobroma* spp. se utilizan en la elaboración de productos alimenticios como jugos, gelatinas, licores y helados, destacando por su agradable sabor y aroma. Si bien *Theobroma cacao* es la especie más conocida, otras como *T. grandiflorum* y *T. bicolor* también han comenzado a domesticarse debido a su valor económico y potencial comercial (Moreira et al., 2024).

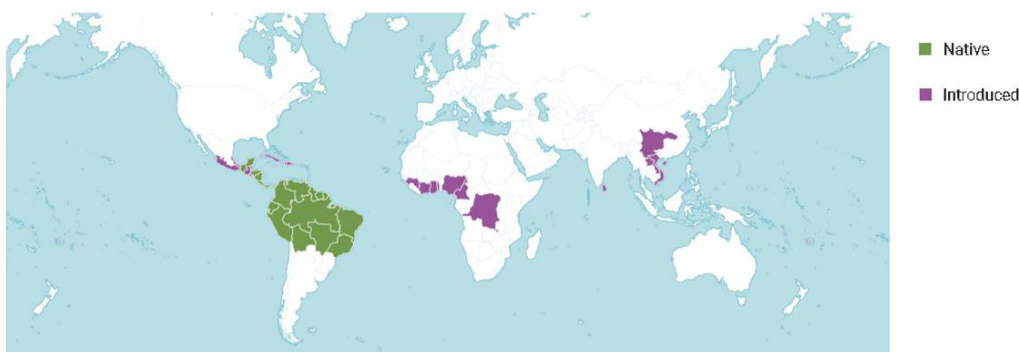


Figura 8. Distribución geográfica del género *Theobroma*

Fuente: (POWO, 2024)

3.4.1. ESPECIES DEL GÉNERO *THEOBROMA*

Actualmente se reconocen 29 especies aceptadas dentro del género *Theobroma*, tal como se muestra en la Figura 9 (POWO, 2024).

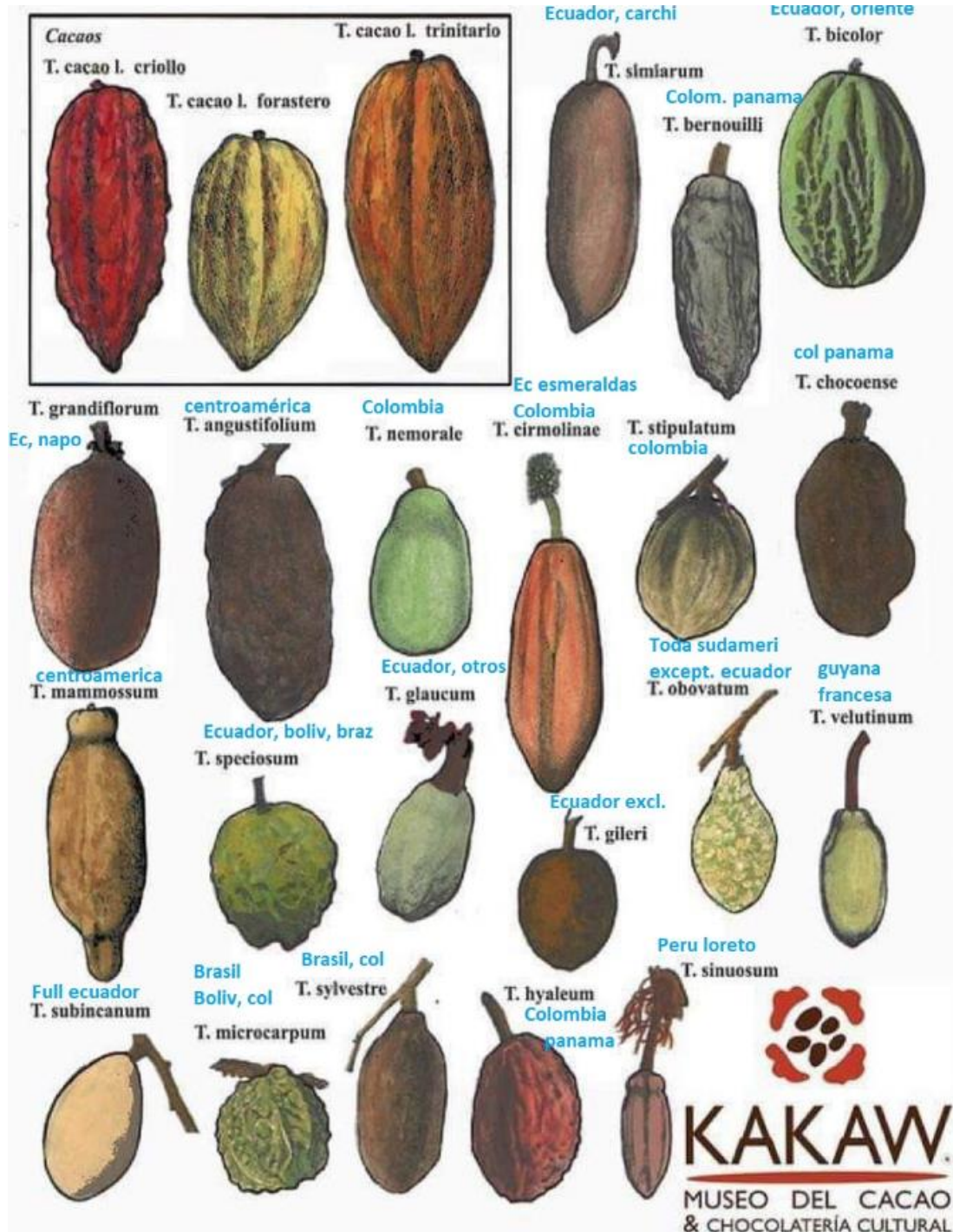


Figura 9. Representación gráfica de los frutos las especies del género *Theobroma*.

Fuente: (Castellanos, 2020)

En la Amazonía, además de *Theobroma cacao* (Figura 10a) se investigan activamente otras especies, tales como: *Theobroma bicolor* (Figura 10b), *Theobroma subincanum* y *Theobroma grandiflorum* (Figura 10c).

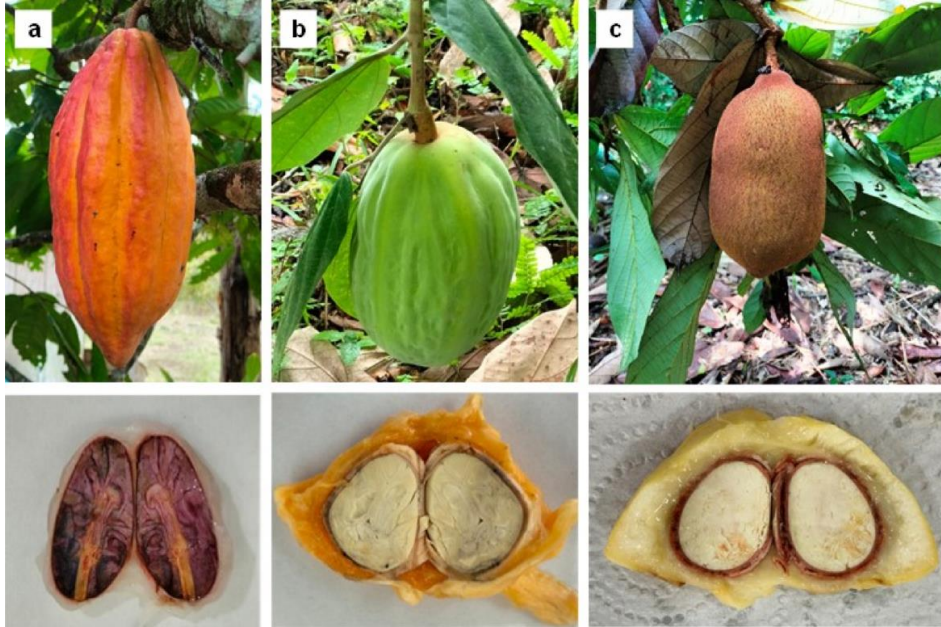


Figura 10. Fotografías de fruto y semillas de a) *T. cacao*; b) *T. bicolor* y c) *T. grandiflorum*

Fuente: (Benlloch et al., 2024)

3.4.2. *THEOBROMA SUBINCANUM*

Su nombre común es “Macambillo” y la planta presenta un fruto similar a *T. Grandiflorum*, aunque de menor tamaño. En esta especie, la pulpa se separa de las semillas, que luego se utilizan en la producción de helados, jugos y licores. Además, sus semillas se pueden combinan con las de *T. cacao* en formulaciones locales para la elaboración de chocolates. Las semillas de *T. subincanum* contienen compuestos bioactivos de elevado interés como teacrina y flavonas, sin embargo su contenido de compuestos fenólicos es menor que en las semillas de *T. cacao* (Febrianto & Zhu, 2022).

3.4.3. *THEOBROMA SPECIOSUM*

Esta especie se conoce vernáculamente en Ecuador como cacao silvestre, pudiendo incluir nombres indígenas de los pueblos Achuar, Kichwa y Waorani. En Brasil se le conoce como cupuí o cacauí. En Bolivia se le llama chocolatillo y en Perú cacao de monte, cacao chancho o cacahuillo (Smith, 2023). Se encuentra distribuida en bosques tropicales desde México hasta el sur de la región amazónica. La planta puede crecer hasta 15 metros de altura, con ramas presentes en la parte alta del tallo de las cuales se originan inflorescencias de color rojo carmín. Se han estudiado diversas partes de esta planta como la cáscara del fruto, las yemas y semillas por su uso culinario. También poseen una aplicación medicinal debido a los diversos compuestos fenólicos y su actividad antioxidante (Mar et al., 2021). La figura 11 muestra las flores, fruto y semillas de esta especie.



Figura 11. Inflorescencia, frutos y semillas de *T. speciosum*

Fuente: (Happiest Plants, 2025)

3.4.4. *THEOBROMA BICOLOR*

A esta especie se le conoce comúnmente en algunos lugares como Pataxte, o cacao cimarrón. Se extiende desde México hasta la región amazónica en Sudamérica. Sus frutos son grandes, con un largo en torno a 30 cm y hasta 15 cm de ancho. El peso es variable pudiendo alcanzar hasta los tres kilogramos. El porcentaje en peso de semillas y de pulpa en la mazorca del fruto es del 23,76% y del 13,70% respectivamente. Se le emplea en bebidas tradicionales y en formulaciones con *T. cacao* (Gálvez et al., 2016). *T. bicolor* posee compuestos bioactivos de interés como compuestos fenólicos y flavonoides, aunque presentes en menor medida que otras especies del género *Theobroma* (Avendaño et al., 2021).

3.4.5. *HERRANIA NITIDA*

A esta especie emparentada con el género *Theobroma* se le conoce en Ecuador como cacao de monte o sacha cacao. En Brasil se le llama Cacao jacaré, en Colombia como cacao silvestre, cacao caimán y en Perú como cacahuillo. Se le encuentra principalmente en la parte occidental de la cuenca Amazónica, en tierras con altitud menor a los 800 metros sobre el nivel del mar. El árbol es pequeño y no supera los ocho metros de altura. Los frutos miden entre 7 a 11 cm de largo y 3 a 5 cm de ancho. Al igual que *T. cacao* posee una pulpa blanquecina, dulce y ligeramente ácida. El fruto puede contener hasta dos docenas de semillas. Posee propiedades medicinales ancestrales, donde las semillas se emplean para tratar el dolor de estómago (Smith, 2023). Investigaciones en Ecuador han demostrado que *H. nitida* posee actividad antioxidante por lo que puede presentar beneficios contra enfermedades crónicas causadas por estrés oxidativo (Coyago-Cruz, Guachamin, Villacís, et al., 2023). La figura 12 muestra los frutos e inflorescencias de esta especie.



Figura 12. Frutos e inflorescencias de *H. nitida*

Fuente: (Smith, 2023)

3.4.6. *THEOBROMA CACAO* L.

Esta especie es la más importante del género *Theobroma*, conocida mundialmente como la materia prima para la producción de chocolate. Además de sus semillas, el fruto contiene un mucílago comestible con un sabor agradable. Se considera que el cacao tiene su origen en la región amazónica de Sudamérica, desde donde se difundió al resto del mundo durante la colonización europea. Hoy en día, su cultivo se ha expandido a varios países de África, que se han convertido en los mayores

productores de esta especie. *Theobroma cacao* incluye diferentes variedades importantes, como Nacional, Criollo, Forastero y Trinitario. En Ecuador, se cultiva principalmente la variedad Nacional, apreciada por su calidad, mientras que la variedad Forastero es la más cultivada a nivel mundial debido a su resistencia y alta productividad (Soares & Oliveira, 2022). Además, de estas variedades, en Ecuador se utiliza la variedad CCN-51, la cual se combina con otras mediante clonación para obtener híbridos con mejores características y mayor rendimiento (Macías et al., 2023).

En la figura 13 se puede observar las partes del fruto del cacao, conformado por una cáscara externa o bagazo donde en su interior protege y almacena las semillas de cacao recubiertas por una pulpa o mucílago. Las semillas a su vez tienen un recubrimiento delgado que protege los cotiledones.



Figura 13. Partes del fruto de *Theobroma Cacao*

Fuente: (Soares & Oliveira, 2022)

3.4.7. COMPUESTOS BIOACTIVOS EN LOS FRUTOS DE *THEOBROMA CACAO* L.

Las semillas de cacao contienen aproximadamente un 10% de compuestos fenólicos, de los cuales el 58% son proantocianidinas, el 37% son flavonoles y flavanoles y el 4-5% antocianinas. Estos compuestos son responsables de la capacidad antioxidante del cacao y se concentran principalmente en los cotiledones

de las semillas, aunque también pueden migrar hacia la cáscara del fruto (Cádiz et al., 2020). En la Tabla 2 se detalla los principales compuestos presentes en diferentes partes del fruto de cacao.

Tabla 2. Compuestos químicos presentes en distintas partes de los frutos de cacao

Compuestos	Bagazo de la mazorca	Mucilago	Cáscara de las semillas
Carbohidratos	29,04 - 32,30	10,70 - 68,35	17,80 - 23,17
Celulosa	24,24 - 35,00	20,80 - 57,50	15,10
Hemicelulosa	8,72 - 11,00	7,00 - 17,00	
Lignina	14,60 - 26,38	12,00 - 14,60	32,41
Pectina	6,10 - 9,20	0,57 - 1,50	0,57 - 1,50
Total de fibra alimenticia	36,60 - 56,10	16,89	18,60 - 60,60
Total de proteínas	4,21 - 10,74	0,41 - 5,56	15,79 - 18,10
Lípidos	1,50 - 2,24	1,91 - 3,54	2,02 - 6,87
Ceniza	6,70 - 10,02	3,70 - 7,68	5,96 - 11,42
Minerales (mg/100g)	3230,85	1297,07	56,75 - 312,57
Total ácidos orgánicos	-	17,52	-
Total compuestos fenólicos *	4,60 - 6,90	-	1,32 - 5,78
Antocianinas **	-	-	0,40
Teobromina	0,34	-	1,30
Cafeína	-	-	0,10
Taninos	5,20	-	3,30 - 4,46
Flavonoles **	-	-	1,50

* (g eq-ácido gálico / 100 g) y ** (µg quercetina / 100 g)

Fuente: (Soares & Oliveira, 2022)

En este contexto, el contenido elevado de flavanoles es responsable del sabor amargo característico de las semillas de cacao. Las epicatequinas (flavan-3-ol), un tipo de flavanol presente tanto en forma monomérica como polimérica (proantocianidinas), representa aproximadamente el 35% de los compuestos fenólicos en las variedades Forastero. Además, las semillas contienen tocoferoles, con concentraciones de 100-300 mg/Kg de lípidos, destacando el γ -tocoferol como el isómero predominante. En *Theobroma subincanum*, se identificaron hasta cuatro isómeros de tocoferoles. Es así como, entre los compuestos adicionales presentes en las semillas se encuentran los fitoesteroles, que poseen una estructura similar al colesterol y, al ser consumidos, inhiben la absorción de colesterol en el organismo

(Cerri et al., 2019). La tabla 3 muestra el contenido de compuestos fenólicos encontrados en distintas partes del fruto de cacao.

Tabla 3. Compuestos fenólicos en distintas partes del fruto de cacao

Compuestos fenólicos	Cáscara de la semilla	Cotiledones de la semilla	Semillas recubiertas de mucílago	Semillas desnudas (sin mucílago)
Ácido clorogénico	n.d.	8,30 ± 0,80	10,52 ± 0,84	11,32 ± 0,63
Ácido ferúlico	n.d.	12,45 ± 1,26	22,62 ± 1,65	18,51 ± 1,51
Ácido cafeico	18,70 ± 0,94	8,92 ± 0,58	13,45 ± 2,54	4,51 ± 0,64
Ácido p-cumárico	10,80 ± 1,84	7,54 ± 0,00	14,52 ± 1,64	10,21 ± 2,15
Ácido p-hidroxicinámico	n.d.	13,07 ± 1,50	23,41 ± 3,54	13,71 ± 1,82
Ácido p-hidroxibenzóico	n.d.	10,41 ± 2,10	0,65 ± 0,17	2,61 ± 0,50
Ácido siríngico	6,21 ± 0,58	n.d.	4,25 ± 0,08	3,43 ± 0,20
Ácido vanílico	3,04 ± 0,06	n.d.	3,65 ± 1,24	6,14 ± 0,42
Ácido protocatéquico	2,61 ± 0,05	1,80 ± 0,04	2,85 ± 0,10	2,16 ± 0,40
Catequina	n.d.	0,61 ± 0,02	1,21 ± 0,06	0,96 ± 0,08
Epicatequina	n.d.	34,25 ± 1,34	32,15 ± 2,54	33,40 ± 0,95
Quercetina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Nota: los resultados se expresan como mg medios /g muestra; n.d. No detectable.

Fuente: (Cerri et al., 2019)

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. MUESTREO

La presente investigación se desarrolló en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana. Se colectaron en la provincia de Pastaza en Ecuador, cuatro especies de cacao, Las muestras fueron colectadas empleando un muestreo aleatorio. Se seleccionaron diez unidades por cada variedad de cacao, asegurando representatividad en la muestra. Las especies colectadas fueron: *Theobroma subincanum* Mart., *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng., *Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl. y *Herrania nitida* (Poepp.) R.E. Schult o *Theobroma asperum* (H. Karst. & Triana). Durante la recolección, las muestras fueron colocadas cuidadosamente en recipientes protegidos con cartón y papel para evitar golpes y abolladuras durante su transporte.

En el Ecuador, la normativa NTE-INEN-177:95 especifica los requisitos del muestreo de cacao en grano, pero con fines comerciales. Debido a la falta de normativa que especifique la cantidad de muestra que se debe considerar para el estudio de frutos enteros o mazorcas de cacao en campo, se utilizó el Instructivo de muestreo de productos agrícolas para análisis de residuos de plaguicidas por lo que se evitó recolectar muestras con defectos visibles (CAC/GL-50-2004, 2014; NTE-INEN-1750, 2012; NTE-INEN-177, 1995).

4.2. CUANTIFICACIÓN FÍSICOQUÍMICA

En las muestras frescas colectadas se determinó el peso, tamaño, pH, sólidos, acidez titulable, humedad y cenizas, tal como se describe a continuación (Coyago-Cruz et al., 2017, 2019):

- **Peso:** Se determinó el peso tanto para el fruto entero (mazorca), así como para las semillas recubiertas de mucílago.
- **Tamaño:** se midió el diámetro ecuatorial y longitudinal empleando un calibrador digital (SuDeLlong, China).
- **pH:** el pH de las semillas se determinó siguiendo las normativas ISO 1842:1991 y NTE-INEN-ISO-1842:2013 “Productos vegetales y de frutas – determinación de pH (IDT)”. Se utilizó un potenciómetro Seven compact S210 (Mettler Toledo, Estados Unidos). Las semillas se trituraron en un mortero. Un gramo de la muestra se colocó en un tubo Falcon, se añadió tres mililitros de agua destilada y se agitó hasta homogenizar. El electrodo se introdujo en la mezcla para la medición del pH (ISO 1842, 2000; NTE-INEN-ISO-1842, 2020).
- **Sólidos solubles:** La determinación se realizó conforme a las normativas ISO 2173 y NTE-INEN-ISO-2173:2013 “Productos vegetales y de frutas – Determinación de sólidos solubles – método refractométrico (IDT)”. Se utilizó un refractómetro manual portátil RHB-32ATC (Hitech, Estados Unidos). Las semillas, se trituraron en un mortero, y un gramo de muestra se transfirió a un tubo Falcon con 3 a 5 mL de agua destilada. La mezcla se calentó en baño maría durante 30 minutos con agitación constante. Una vez enfriada, se depositó una porción sobre el prisma del refractómetro para medición los sólidos solubles en °Brix (NTE-INEN-ISO-2173:2013, 2013; US-ISO-2173, 2009).
- **Acidez titulable:** Se siguió las normativas ISO-750 y NTE-INEN-ISO-750 “Productos vegetales y de frutas – determinación de la acidez titulable (IDT)”. Se pesó un gramo de semillas trituradas y se mezcló con agua destilada hasta un volumen de 10 mL, agitando vigorosamente antes de proceder con la titulación con hidróxido de sodio 0,1 N. El porcentaje de acidez se calculó empleando la ecuación 1 (NTE-INEN-ISO-750:2013, 2013; US-ISO-750, 2009).

Ecuación 1:

$$acidez (\%) = \frac{V_{agua} * V_T * N_T * mEq}{m_s * V_s} * 100$$

Donde:

- V_{agua} volumen del aforo de agua inicial (mL)
- V_T Volumen de la solución titulante de NaOH: 0,1 N (mL)
- N_T Normalidad de la solución titulante de NaOH: 0,1 N (mEq-g/mL)
- mEq Miliequivalentes químicos gramo de ácido predominante: cítrico (0,064 g/meq-g ac. cítrico)
- m_s masa de la muestra a titular (g)
- V_s volumen de la muestra a titular (mL)

- Humedad: se determinó por gravimetría usando una balanza analítica ME204TE/00 (Mettler Toledo, Estados Unidos). Se pesó un gramo de muestra en cajas Petri y se colocó en una estufa BE-20 (Memmert GmbH+Co.KG, España) a 105°C por cinco horas (hasta obtener un peso constante). Tras el secado, las cajas se enfriaron en un desecador y se volvieron a pesar. La humedad se calculó usando la ecuación 2 (García-Mogollon et al., 2017; NTE-INEN-1953, 2012).

Ecuación 2:

$$\% Humedad = \frac{m_{cp} + m_s inicial - m_T final}{m_s inicial} * 100$$

Donde:

- $m_T final$ masa total final seca (caja Petri + muestra; g)
- $m_s inicial$ masa inicial de la muestra húmeda (g)
- m_{cp} masa inicial de la caja Petri antes de tarar (g)

- Ceniza: Se pesó 1 g de muestra triturada en crisoles. Las muestras se incineraron en una mufla Thermolyne (Thermo Scientific, Estados Unidos) a 500°C durante cuatro horas o hasta observar presencia de cenizas blancas. Posteriormente, los crisoles se enfriaron en un desecador y se pesaron nuevamente. El porcentaje de cenizas se calculó empleando la ecuación 3 (ISO 5520, 1981; NTE-INEN-ISO-2171:2013, 2020).

Ecuación 3:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{m_{T \text{ final}} - m_c}{m_s \text{ inicial}} * 100$$

Donde:

- m_T final masa total final (crisol + muestra; g)
- m_s inicial masa inicial de la muestra (g)
- m_c masa inicial del crisol antes de tarar (g)

4.3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

Para la cuantificación de compuestos bioactivos que consideró la cuantificación de carotenoides y fenoles totales, se tomó las semillas, las cuales se congelaron a -80°C y luego se liofilizaron en un equipo Alpha 1-4 LSCplus (Martin Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Alemania) a una presión de 0,31 mbar. Las muestras liofilizadas se molieron y almacenaron en refrigeración hasta el respectivo análisis (Coyago-Cruz, 2017).

4.3.1. CAROTENOIDES TOTALES

Se pesó en una balanza analítica ME204TE/00 (Mettler Toledo, Estados Unidos) 20 mg de muestras liofilizadas de semillas dentro de tubos eppendorf de 2 mL. Se

adicionó 500 µL de una mezcla de metanol:acetona:diclorometano (1:1:2 v/v/v), se homogenizó mediante agitación en un vortex por dos minutos y se ultrasonificó en un baño FS50D (Fischer Scientific, Estados Unidos) por dos minutos. Las muestras homogenizadas se sometieron a centrifugación en una microcentrífuga 5430 R (Eppendorf, Alemania) a 14 000 rpm durante tres minutos a 4°C. Se separó y recolectó el sobrenadante (fase de color amarillo-naranja). El remanente dentro del tubo eppendorf se extrajo nuevamente con 500 µL de cloroformo realizando el mismo procedimiento, el cual fue repetido hasta observar que ausencia de color en la fase sobrenadante. El total recolectado de fase orgánica se evaporó en un rotavapor R-100 (Buchi, Suiza) a una temperatura de máximo 30°C y protegiendo las muestras de la luz, con la intención de evitar foto-degradación. La extracción se realizó por duplicado.

El extracto seco se redisolvió en etanol grado HPLC hasta un volumen de aforo de 2 mL. Los carotenoides totales se cuantificaron a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro de placas UV-VIS Epoch (Biotek, Estados Unidos). Para la curva de calibración se partió de una solución madre o stock de 8.3 mg de β-caroteno en 25 mL, a partir de la cual se prepararon concentraciones de 0,024 a 0,094 mg/mL (Coyago-Cruz, Guachamin, Vera, et al., 2023; Coyago et al., 2017). La ecuación 4 se usó para obtener la concentración de carotenoides totales interpolada de la curva de calibración y la ecuación 5 se empleó para la expresar el contenido de carotenoides totales como equivalentes a µg β-caroteno por cada gramo de muestra seca.

Ecuación 4:

$$CTi = OA + (m * Abs)$$

Donde:

- CTi concentración carotenoides totales interpolados de la recta de calibración (mg β-caroteno / mL).
- OA ordenada al origen de la ecuación de la recta de calibración
- m pendiente de la recta de calibración

- Abs Absorbancia medida a λ 450 nm

Ecuación 5:

$$CT = \frac{CTi * V_s * D}{m_s} * 1000$$

Donde:

- CT concentración carotenoides totales (μg β -caroteno / g muestra seca)
- CTi concentración carotenoides totales interpolados de la recta de calibración (mg β -caroteno / mL).
- V_s Volumen inicial de aforo de las muestras (μL)
- D Factor de dilución en caso de que haya requerido.
- m_s masa de la muestra liofilizada (mg)

4.3.2. COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES

Se pesó en una balanza analítica ME204TE/00 (Mettler Toledo, Estados Unidos) 40 mg de muestra liofilizada de semillas dentro de tubos eppendorf de 2 mL. Se adicionó 500 μL de una solución de metanol al 80% acidificado con ácido clorhídrico al 0,1%. Se homogenizó en un vortex por dos minutos y se ultrasonificó en un baño FS50D (Fischer Scientific, Estados Unidos) por dos minutos. Las muestras se sometieron a centrifugación en una microcentrífuga 5430 R (Eppendorf, Alemania) a 14 000 rpm durante tres minutos. Se repitió el procedimiento por dos ocasiones más adicionando 500 μL de metanol acidificado, el sobrenadante se guardó en refrigeración hasta el respectivo análisis. Se tomaron 20 μL del extracto se adicionó 100 μL de la solución de Folin-Ciocalteu (1:4), se agitó durante un minuto, se añadió 75 μL de carbonato de calcio (100 g/L) y se volvió a agitar por otro minuto. Se dejó reposar durante 120 minutos en un lugar alejado de la luz para que ocurra la reacción química correspondiente. Transcurrido este tiempo, se cuantificó los

compuestos fenólicos totales a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro de placas UV-VIS Epoch (Biotek, Estados Unidos). Como estándar se utilizó una concentración de ácido gálico que se preparó en concentraciones de 10; 20; 25; 33,3; 50 y 100 μg ácido gálico/ mL para elaborar la respectiva curva de calibración (Coyago-Cruz, 2017). La concentración de fenoles totales se calculó empleando la ecuación 6 y posteriormente esta concentración fue expresada en mg equivalentes de Ac. Gálico por 100 mg de muestra seca (mg EAG / 100g ps) con la ecuación 7.

Ecuación 6:

$$CFTi = OA + (m * Abs)$$

Donde:

- CFTi concentración compuestos fenólicos totales interpolados de la recta de calibración (μg ácido gálico / mL).
- OA ordenada al origen de la ecuación de la recta de calibración
- m pendiente de la recta de calibración
- Abs Absorbancia medida a λ 750 nm

Ecuación 7:

$$CFT = \frac{CFTi * V_s * D}{m_s} * 100$$

Donde:

- CFT concentración compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico / 100 g muestra seca)
- CFTi concentración compuestos fenólicos totales interpolados de la recta de calibración (μg ácido gálico / mL).
- V_s Volumen inicial de aforo de las muestras (mL)
- D Factor de dilución en caso de que haya requerido.
- m_s masa de la muestra liofilizada (mg)

4.4. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó empleando la metodología ABTS. Se pesó en una balanza analítica 20 mg de muestras liofilizadas de semillas dentro de tubos eppendorf de 2 mL. Se adicionó 400 μ L de metanol grado HPLC y 400 μ L de agua destilada. La mezcla se homogenizó en un vortex por dos minutos y se ultrasonificó por tres minutos. Las muestras se centrifugaron 14 000 rpm durante cuatro minutos y se recuperó el sobrenadante. Se adicionó 560 μ L de acetona y 240 μ L de agua destilada. Se volvió a realizar el proceso de homogenización y se recuperó nuevamente el sobrenadante para mezclarlo con el obtenido anteriormente.

Se preparó el radical ABTS⁺ empleando una solución 7 mM de ABTS que se hizo reaccionar con una solución de 2,45 mM de persulfato de potasio en proporción 1:1 v/v durante 16 horas en la oscuridad. La solución del radical se diluyó en etanol puro 1:10. Para la cuantificación de la actividad antioxidante de las muestras, en colocó en cada pocillo 10 μ L del extracto y se añadió 200 μ L del radical ABTS⁺. Luego se procedió a leer la placa a una longitud de onda de 270 nm en un espectrofotómetro de placas UV-VIS.

Se preparó una solución madre de Trolox pesando 15,8 mg de estándar y se aforó a 25 mL. Se realizó diluciones (v/v) de 1:3; 1:5; 1:10; 1:20; y 1:25. Se construyó una curva de porcentaje de inhibición vs concentración de Trolox (X vs Y) para obtener la curva de calibración. Los resultados se expresaron como miliequivalentes de Trolox por cada 100 gramos de muestra seca (Coyago-Cruz et al., 2024). Las ecuaciones 8, 9 y 10 se emplearon para el cálculo de la actividad antioxidante de las muestras. La preparación de muestras se realizó por duplicado y la preparación para la cuantificación se realizó por cuadruplicado.

Ecuación 8:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Abs_{ABTS^+} - Abs_s}{Abs_{ABTS^+}} * 100$$

Donde:

- Abs_{ABTS^+} Absorbancia de la solución del radical $ABTS^+$
- Abs_s Absorbancia de la muestra adicionado el radical $ABTS^+$

Ecuación 9:

$$CmMET_i = OA + (m * \%Inhibición)$$

Donde:

- $CmMET_i$ Concentración de milimol de eq. trolox interpolada de la recta de calibración en función del % inhibición (mM-Trolox)
- OA ordenada al origen de la ecuación de la recta de calibración
- m pendiente de la recta de calibración

Ecuación 10:

$$CmMET = \frac{CmMET_i * V_s * D}{m_s} * 100$$

Donde:

- $CmMET$ concentración de milimol de equivalentes trolox (mmol eq-Trolox / 100 g muestra seca)
- $CmMET_i$ Concentración de milimol de eq. trolox interpolada de la recta de calibración en función del % inhibición (mM-Trolox)
- V_s Volumen de aforo inicial de las muestras (mL)
- D Factor de dilución en caso de que aplique.
- m_s masa de la muestra liofilizada (g)

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizó el software estadístico Sigmaplot, del desarrollador Estadounidense Grafiti LLC, en su versión 14 y ejecutada en el sistema operativo Microsoft Windows™ 10.

En el software se realizó un análisis de comparación de medias para cada especie estudiada mediante un ANOVA simple para determinar si existen diferencias significativas y posteriormente se realizó una prueba Tuckey para determinar cuáles especies fueron significativamente diferentes para cada uno de los ensayos: fisicoquímicos, de cuantificación de compuestos bioactivos (carotenoides totales y compuestos fenólicos totales) y de actividad antioxidante. Se trabajó con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. CUANTIFICACIÓN FÍSICOQUÍMICA

En la Figura 14 se presenta los pesos de las semillas y del fruto completo de los cacaos en estudio. Así, el peso del fruto varió entre 36,69 g (*H. nitida*) a 2066,67 g (*T. bicolor*). A su vez, el peso de las semillas varió entre 1,56 g (*T. speciosum*) a 5,38 g (*T. bicolor*). Los resultados mostraron que el cacao *T. bicolor* presentó el mayor peso comparado con las otras especies, lo mismo ocurrió con el valor de las semillas que reportaron el mayor peso en esta variedad, seguido de la variedad *H. nitida*.

Estos resultados fueron comparables con datos reportados por otros autores quienes presentaron un rango de 300,00 a 4000,00 g para el peso de *T. bicolor* (Hernández et al., 1998). En los ejemplares ecuatorianos de cacao blanco (*T. bicolor*) cultivados en la región costera se encontró que el peso del fruto osciló entre 714 a 1443,00 g; con un peso total de almendras frescas de 362,15 g; distribuidas en unas 40 semillas por fruto, resultando en un peso promedio de 9,05 g por semilla (Vera et al., 2024).

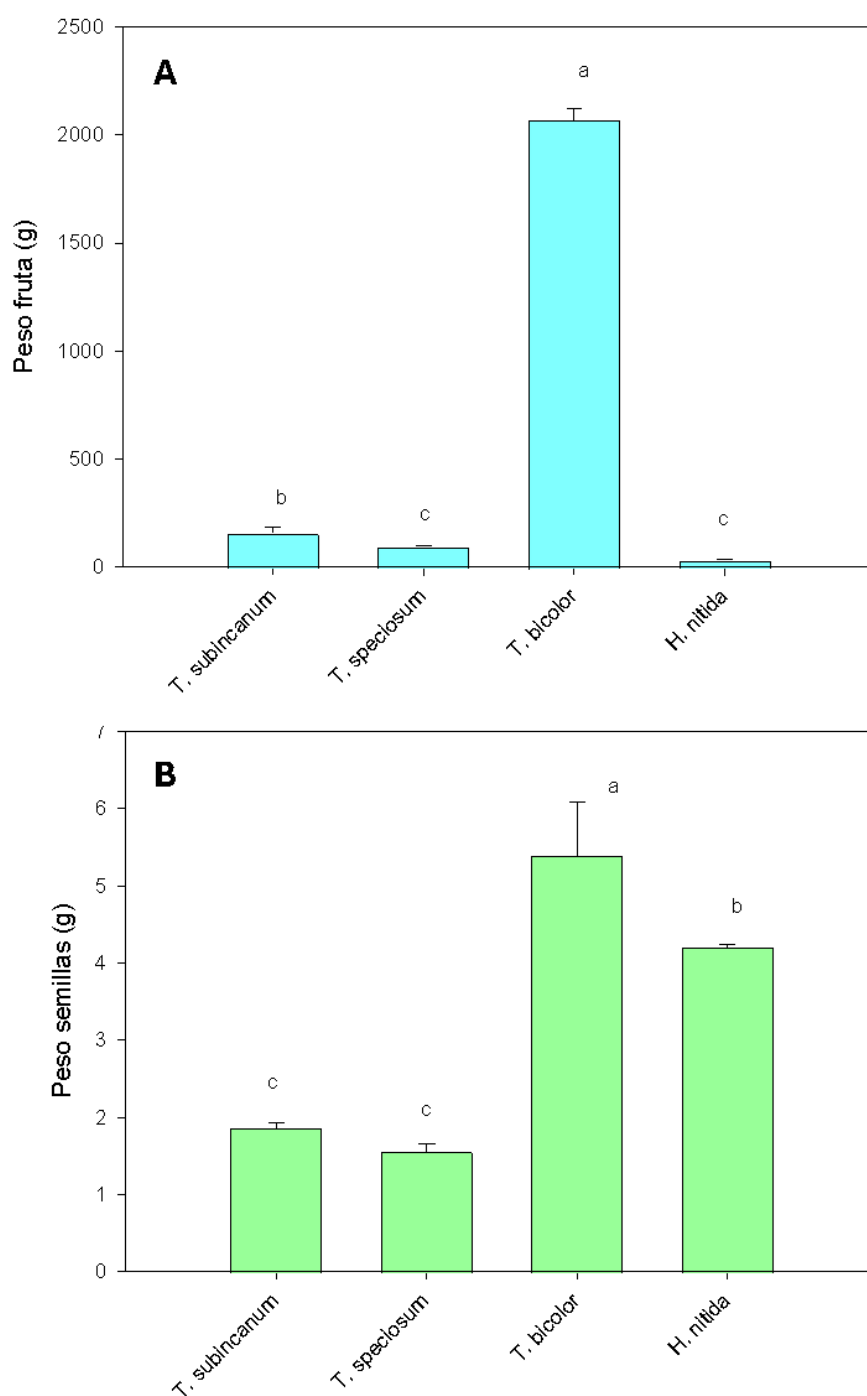


Figura 14. Valores promedio de peso de los frutos y las semillas de las cuatro especies de cacao en estudio.

Nota: A), peso de los frutos; B), peso de las semillas. El valor máximo de la barra señala el valor promedio, y la línea vertical sobre la barra indica el error estándar de los valores en estudio. Las diferentes letras minúsculas sobre las barras señalan los grupos homogéneos con Tukey, $p < 0,05$.

En la Figura 15 se presentan los valores promedio del diámetro ecuatorial y longitudinal de las especies de cacao en estudio. Así, el diámetro ecuatorial varió entre 12,39 mm (*T. speciosum*) a 65,11 mm (*T. subincanum*), mientras que el diámetro longitudinal varió entre 21,84 mm (*T. speciosum*) a 93,34 mm (*H. nitida*). Los resultados mostraron diferencias significativas entre los diferentes tamaños de las especies de cacao en estudio. Otros estudios presentados en *T. subincanum*, *T. speciosum*, *T. bicolor* y *T. cacao* cultivados en Brasil obtuvieron una longitud de semilla de 18,30 mm; 18,60 mm; 28,30 mm y 27,30 mm para cada especie y de ancho de semilla de 12,60 mm; 12,50 mm; 20,20 mm y 14,00 mm respectivamente (Santos et al., 2012).

Al comparar los resultados entre otros autores y los resultados de las dimensiones de las semillas en estudio, se observó que para la mayoría de las muestras difieren. Esto se debe a que las mediciones en la investigación se realizaron considerando el mucílago que recubre las semillas. Mientras que otros autores realizaron la medición de las semillas luego de separar el mucílago. Sin embargo, de todas las especies analizadas es importante observar cómo los resultados fueron similares a los reportados en otros trabajos para *T. speciosum*. Esto se debe a que la capa de mucílago que recubre las semillas es muy delgada en esta especie de cacao.

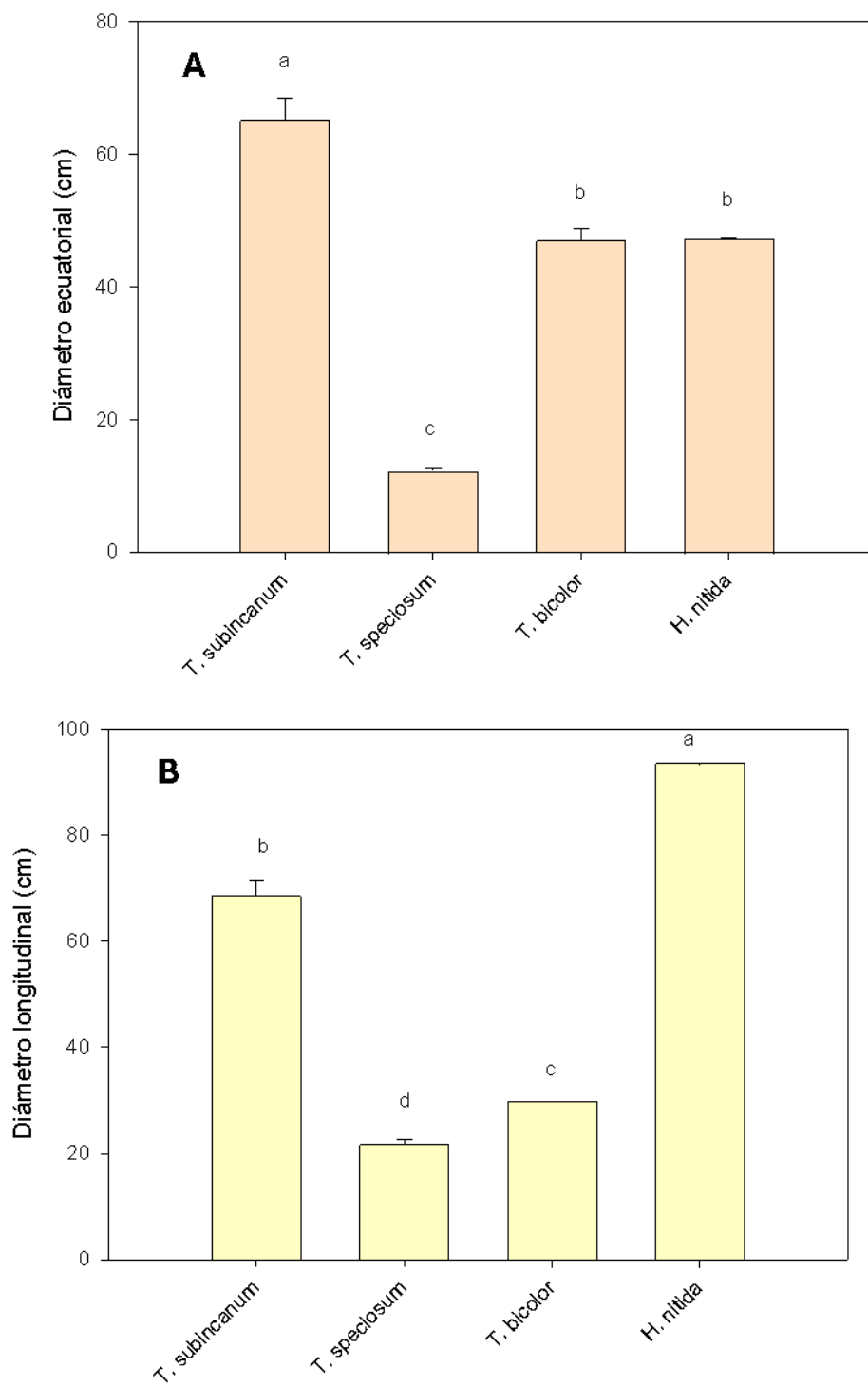


Figura 15. Valores promedio del diámetro ecuatorial y longitudinal de las cuatro especies de cacao en estudio.

Nota: A), diámetro ecuatorial; B) diámetro longitudinal. El valor máximo de la barra señala el valor promedio, y la línea vertical sobre la barra indica el error estándar

de los valores en estudio. Las diferentes letras minúsculas sobre las barras señalan los grupos homogéneos con Tukey, $p < 0,05$.

En la Figura 16 se presentan los valores promedio de pH (A), sólidos solubles (B), % de acidez titulable (C), % de humedad (D) y % de ceniza (E) de las cuatro muestras en estudio. Es así como el valor de pH varió entre 3,69 (*T. subincanum*) hasta 6,70 (*T. bicolor*). En este sentido, los valores de pH de la variedad *T. bicolor* presentan un valor aproximado de pH de 6,00 ligeramente ácido (Gálvez et al., 2016; Hernández et al., 1998), comparable con los resultados reportados en esta investigación.

En el caso de los sólidos solubles los resultados variaron entre 6,00 °Brix (*T. bicolor*) hasta 10,00 °Brix (*H. nitida*). El porcentaje de acidez titulable varió entre 0,43% (*T. bicolor*) a 1,72% (*T. subincanum*). Es así como los resultados encontrados en este estudio fueron comparables con los resultados de otros autores, quienes reportaron en ejemplares de *T. bicolor* estudiados en México, una acidez de 0,45% (Gálvez et al., 2016).

El contenido de humedad se encontró entre que varió entre 37,55% (*H. nitida*) a 92,71% (*T. bicolor*) y el porcentaje de ceniza entre 1,96% (*T. bicolor*) a 2,63 % (*H. nitida*). Los resultados de este estudio resultaron ser menores a los reportados por otros autores en ejemplares de *T. bicolor* estudiados en México, con un porcentaje de cenizas de 3,53% (Gálvez et al., 2016). Además, otros estudios mostraron que el contenido de humedad de las semillas recubiertas de mucílagos alcanzaron valores de 35,58% (García Torres et al., 2002), este valor resultó comparable con los resultados obtenidos en este estudio.

Es importante acotar que las variaciones presentadas entre los resultados de la investigación respecto a otros autores se pueden deber al origen, ubicación geográfica, sustrato sobre el cual crecen las especies y también la época del año en que se realizó la recolección de los frutos y su estado de madurez que pueden de una u otra manera afectar a las características fisicoquímicas de las semillas.

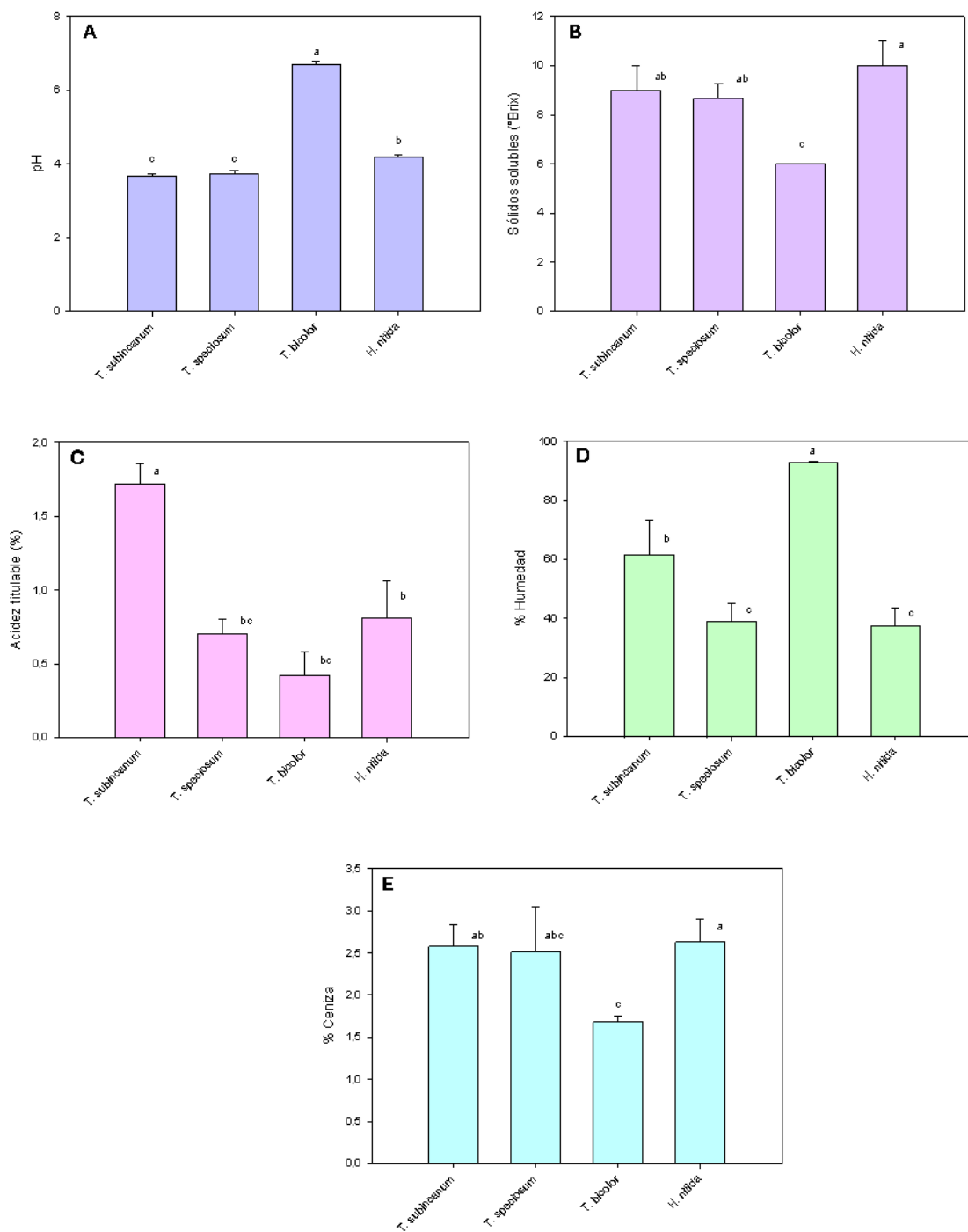


Figura 16. Valores promedio pH, sólidos solubles, % acidez titulable, % humedad y cenizas de las cuatro especies de cacao en estudio.

Nota: El valor máximo de la barra señala el valor promedio, y la línea vertical sobre la barra indica el error estándar de los valores en estudio. Las diferentes letras minúsculas sobre las barras señalan grupos homogéneos con Tukey, $p < 0,05$.

5.2. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

5.2.1. CAROTENOIDES TOTALES

En la Figura 17 se presenta los valores promedio de carotenoides totales en las semillas de las cuatro muestras en estudio. La concentración de carotenoides totales varió entre 25,47 μg β -caroteno/ 100 g muestra seca (PS) (*T. speciosum*) hasta 600,43 μg β -caroteno / 100 g PS (*T. subincanum*). Es así como los resultados de carotenoides totales de este estudio fueron comparables con los resultados presentados por otros autores, en *H. nitida* quienes reportaron un contenido de carotenoides como la suma de los compuestos individuales de 900 μg β caroteno/ 100 g de muestra (Coyago-Cruz, Guachamin, Villacís, et al., 2023). Además, estudios realizados en otras partes de la planta, como las hojas, revelaron concentraciones de 325,62; 322,21 y 306,98 μg β caroteno/ g para los genotipos Forastero, Nacional y Trinitario de *T. cacao*, respectivamente, lo que indica que estas moléculas bioactivas se acumulan no solo en los frutos, sino también en otras estructuras vegetativas (Veintimilla, 2020).

Al comparar el contenido de carotenoides totales de *H. nitida* en esta investigación frente a los resultados obtenidos en otro estudio en Ecuador, se observa que el valor obtenido en este trabajo es aproximadamente la décima parte, nuevamente se debe hacer hincapié en las características del terreno, los nutrientes, la ubicación, la época del año y el estado de madurez del fruto que pudieron haber causado esta diferencia significativa. Se debe mencionar que no existe una amplia información referente a contenido de carotenoides en estas especies del género *Theobroma* y mucho menos en aquellas nativas del Ecuador, por lo que en futuras investigaciones se debería considerar estas variables anteriormente mencionadas y continuar estudiando el contenido de carotenoides en estos cacaos.

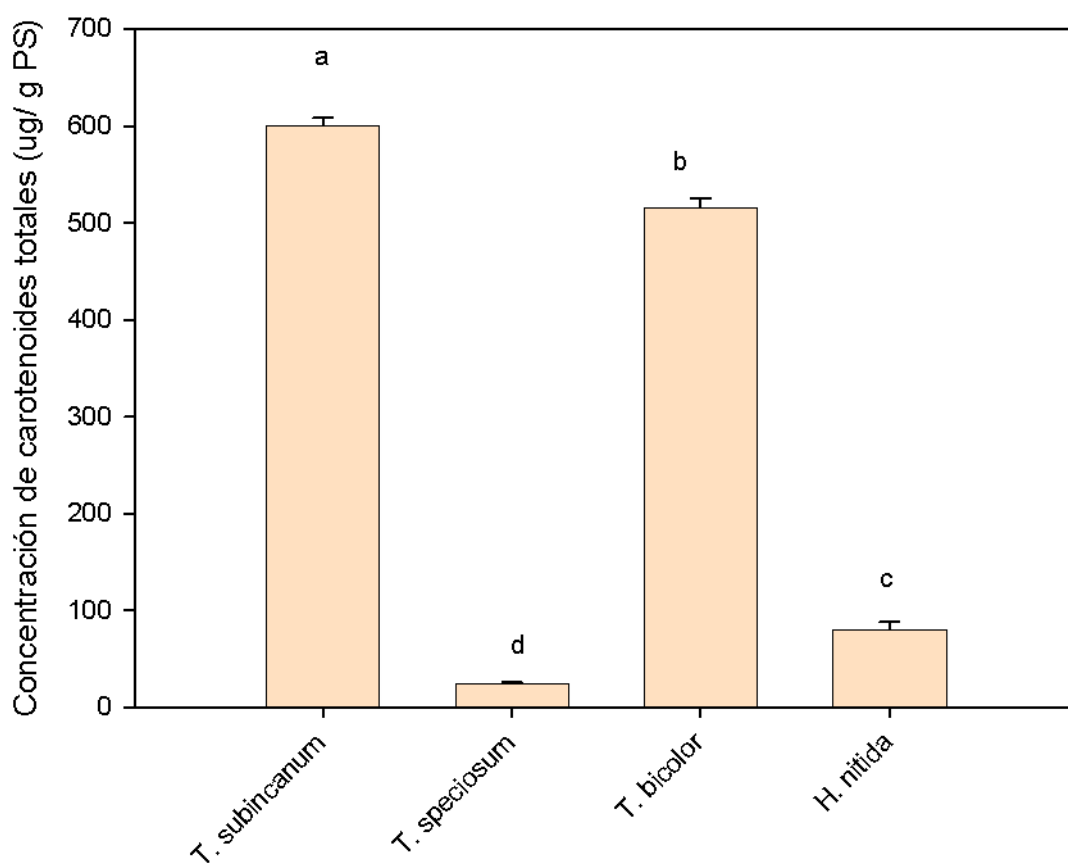


Figura 17. Valores promedio de carotenoides totales presentes en las cuatro especies de cacao en estudio

Nota: El valor máximo de la barra señala el valor promedio, y la línea vertical sobre la barra indica el error estándar de los valores en estudio. Las diferentes letras minúsculas sobre las barras señalan grupos homogéneos con Tukey, $p < 0,05$.

5.2.2. FENOLES TOTALES

En la Figura 18 se muestra los resultados promedio de los compuestos fenólicos totales en las semillas de las cuatro muestras en estudio. La concentración de fenoles totales varió entre 10,27 mg equivalentes de ácido gálico (EAG) / 100 g muestra seca (PS) (*T. bicolor*) hasta 731,33 mg EAG / 100 g muestra seca (*H. nitida*). Es así que los resultados en este estudio fueron comparables con otros estudios en ejemplares de *H. nitida*, y dos ejemplares de *T. cacao* (el primero con coloración

roja y el segundo con coloración amarilla) quienes presentaron concentración de compuestos fenólicos totales como una suma de los compuestos individuales de 1900,00; 1530,00 y 820,00 mg eq. ácido gálico/ 100 g muestra seca (Coyago-Cruz, Guachamin, Villacís, et al., 2023). Para el caso de *H. nitida*, al igual que con el contenido de carotenoides totales, aquí se observa que el valor obtenido con respecto a otra investigación en Ecuador es menor. Como ya se discutió esto se puede deber al origen, época del año, madurez del fruto y sustrato sobre el que crecen las plantas, a pesar de ser de la misma especie, son especímenes con características y composiciones de moléculas bioactivas diferentes. Si bien no se analizó *T. cacao* en esta investigación, los datos de otros autores son un buen referente para entender el contenido de compuestos fenólicos totales en diferentes especies dentro del género.

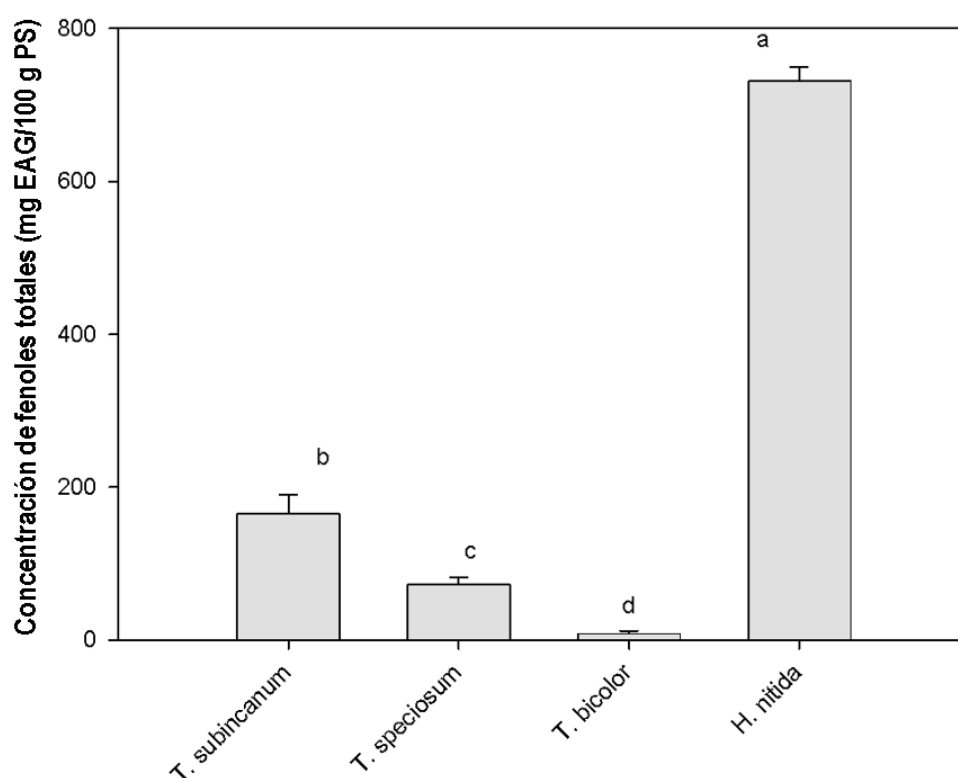


Figura 18. Valores promedio de compuestos fenólicos totales presentes en las cuatro especies de cacao en estudio

Nota: El valor máximo de la barra señala el valor promedio, y la línea vertical sobre la barra indica el error estándar de los valores en estudio. Las diferentes letras minúsculas sobre las barras señalan grupos homogéneos con Tukey, $p < 0,05$. (n=4)

5.3. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La Figura 19 muestra los resultados de actividad antioxidante por método ABTS para las cuatro muestras se prueba. Se demostró que efectivamente existe inhibición del radical, por lo que se muestra una capacidad de neutralización de las especies reactivas de oxígeno. Para las semillas de las cuatro especies de estudio se obtuvieron valores comprendidos en el rango de La actividad varió entre 1,3 mmol ET/100 g PS (*T. speciosum*) hasta 5,7 mmol ET/100 g PS (*T. bicolor*). Es así como los resultados de este estudio fueron comparables con los resultados encontrados por otros autores en *H. nitida* que mostraron una actividad antioxidante por la metodología ABTS de 92,0 $\mu\text{mol ET / g PS}$ equivalente a 9,2 mmol ET/100 g PS. A modo de establecer una referencia, para *T. cacao* se determinó una actividad antioxidante por ABTS entre 110,8 a 111,2 $\mu\text{mol ET / g PS}$ equivalente a 11,08 a 11,12 mmol ET/100 g PS (Coyago-Cruz, Guachamin, Villacís, et al., 2023). Observándose que los resultados obtenidos para las cuatro especies en estudio fueron menores que para *T. cacao*. Pero que deben considerarse variables al momento del muestreo para poder realizar una mejor comparación (sustrato, ubicación, época del año y madurez del fruto). Además, otro estudio mostró que la actividad antioxidante de *T. grandiflorum* (otra especie dentro del género *Theobroma*), fue de 29,00 $\mu\text{mol ET / g PS}$ equivalente a 2,90 mmol ET / 100 g PS para las semillas frescas del fruto (Benlloch et al., 2024). Encontrándose en concordancia dentro del rango obtenido para la presente investigación.

Con respecto a *H. nitida* se observa un valor menor de actividad antioxidante comparándola con otros trabajos en Ecuador, esto no es nuevo ya que carotenoides y compuestos fenólicos son moléculas que le otorgan esta propiedad y a menor concentración de estos, se estima que su actividad antioxidante sea menor.

Las razones de la variación se pueden atribuir a los especímenes recolectados y no a la especie propiamente. Otros estudios realizados en otras frutas y verduras como el tomate han demostrado que la cantidad de carotenoides y compuestos fenólicos muestra cambios en función de los estados de desarrollo de los frutos, las variedades dentro de la especie, la temporada o época del año, e incluso el racimo que se muestrea de una planta (Coyago-Cruz et al., 2018). En virtud de lo anteriormente expuesto se debería considerar analizar muy bien estos parámetros para llevar a cabo una investigación más exhaustiva. Para el propósito de la presente investigación, se observa que las cuatro especies de *Theobroma* en estudio muestran actividad antioxidante importante.

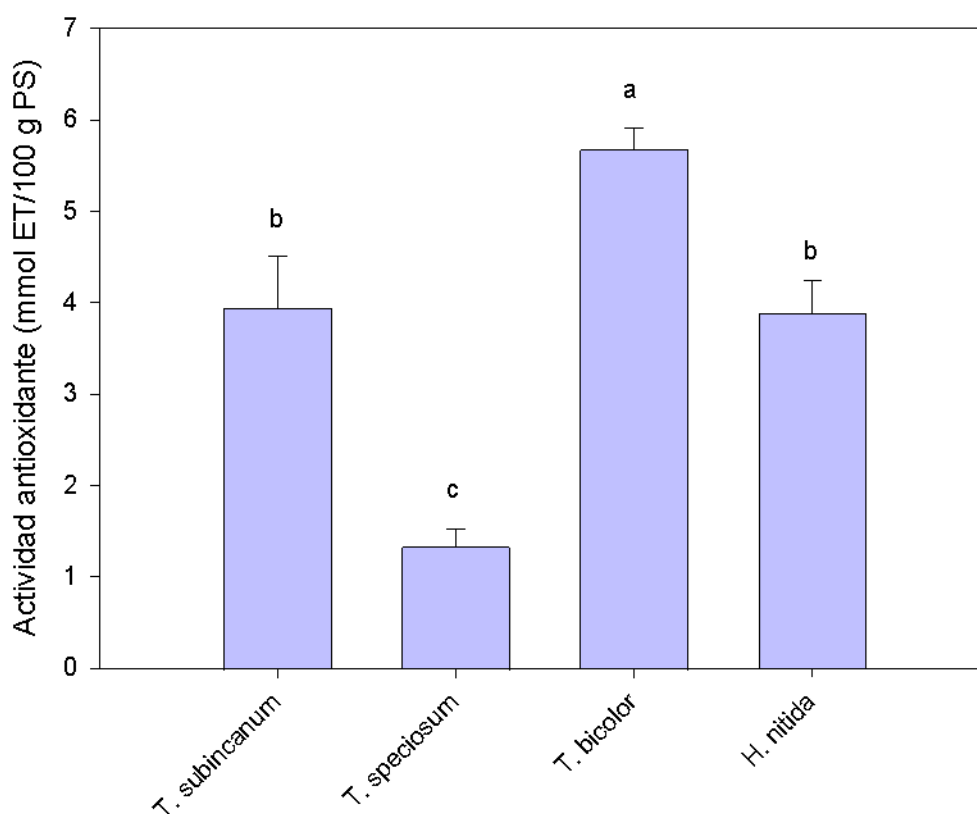


Figura 19. Resultados medios de actividad antioxidante in vitro por método ABTS para las cuatro especies de cacao en la Amazonía ecuatoriana

Nota: El valor máximo de la barra señala el valor promedio, y la línea vertical sobre la barra indica el error estándar de los valores en estudio. Las diferentes letras minúsculas sobre las barras señalan grupos homogéneos con Tukey, $p < 0,05$. (n=4)

6. CONCLUSIONES

El cacao aromático empleado para la elaboración de chocolate es una especie muy estudiada, sin embargo, en Ecuador existen otras especies que han sido poco estudiadas. Esta investigación llevada a cabo en cuatro especies de cacao permitió lograr un mejor entendimiento de las características fisicoquímicas de sus frutos y semillas, así como del contenido total de carotenoides y compuestos fenólicos presentes en semillas frescas, cuando no ha existido fermentación. La actividad antioxidante por el método ABTS demostró la capacidad de estos extractos liofilizados para neutralizar radicales libres.

La caracterización fisicoquímica demostró que, para las cuatro especies de cacao en estudio, existieron diferencias significativas en cuanto al peso de fruto, peso de semillas, diámetros ecuatorial y longitudinal. Para las semillas el pH fue ácido entre 3,69 a 6,70. Los sólidos solubles se encontraron entre 6,00 a 10,00 °Brix, la acidez titulable fue menor a 2,00%. La humedad varió entre 37,55 a 92,71% y el contenido de cenizas menor a 3,00%, concluyendo que, a pesar de pertenecer a la misma familia, y encontrarse estrechamente relacionadas dentro del género *Theobroma*, existieron diferencias significativas entre las distintas especies de cacao.

Con respecto a los compuestos bioactivos evaluados, el contenido de carotenoides totales varió entre 25,47 a 600,43 $\mu\text{g } \beta\text{-caroteno/ 100 g PS}$ obteniéndose los valores más altos para *T. subincanum*. Para los compuestos fenólicos totales se obtuvo resultados entre 10,21 a 731,33 $\text{mg ácido gálico/ 100 g muestra seca}$, donde el valor más alto y estadísticamente diferente al resto de especies fue para *H. nitida*. En el caso de actividad antioxidante esta varió entre 1,34 a 5,67 $\text{mmol eq-trolox/ 100 g PS}$. Difiriendo con valores reportados en otras investigaciones en parte debido a las distintas procedencias de los frutos, composición de suelos y factores ambientales.

REFERENCIAS

- Alara, O., Abdurahman, N., & Ukaegbu, C. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200–214.
<https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.03.011>
- Albrecht, C., Zizich, N., Garnero, S., Scavuzz, M., & Cervilla, N. (2019). *Manual de frutas y hortalizas : propiedades físico-químicas y condiciones de manipulación y conservación*. (Primera, Issue September). Córdoba.
https://www.researchgate.net/publication/337496272_Manual_de_frutas_y_hortalizas_propiedades_fisico-quimicas_y_condiciones_de_manipulacion_y_conservacion
- Avendaño, C., Campos, E., López, C., Martínez, M., Caballero, J., Báez, M., Ariza, R., & Cadena, J. (2021). Actividad antioxidante en genotipos de *Theobroma* spp. (Malvaceae) en México. *Revista de Biología Tropical*, 69(2).
<https://doi.org/10.15517/RBT.V69I2.41626>
- Benlloch, M., Nuñez, S., García, P., Gentile, P., & Girón, J. (2024). *Theobroma* genus: Exploring the therapeutic potential of *T. grandiflorum* and *T. bicolor* in biomedicine. *Food Bioscience*, 61, 104755.
<https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2024.104755>
- Borja, J., Horta, H., Peñaloza, G., Sandoval, A., & Mendez, J. (2022). Antioxidant activity, total polyphenol content and methylxantine ratio in four materials of *Theobroma cacao* L. from Tolima, Colombia. *Heliyon*, 8(5), e09402.
<https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2022.E09402>
- CAC/GL-50-2004. (2014). Directrices generales sobre muestreo (CAC/GL 50-2004, IDT). *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 4, 78.
https://www.fao.org/input/download/standards/10141/CXG_050s.pdf
- Cádiz, M., Fernández, Á., Leyva, F., Guerrero, N., Villegas, M., Pimentel, S., Ramos, F., & Segura, A. (2020). LC-MS and spectrophotometric approaches for evaluation of bioactive compounds from Peru cocoa by-products for commercial applications.

Molecules 2020, Vol. 25, Page 3177, 25(14), 3177.

<https://doi.org/10.3390/MOLECULES25143177>

Castellanos, H. (2020). *Cacaos y algunas otras especies de "Theobromas."*

https://www.facebook.com/photo.php?fbid=2392982190801806&set=pb.100002701462420.-2207520000&type=3&locale=es_LA

Cerri, M., Reale, L., & Zadra, C. (2019). Metabolite storage in *Theobroma cacao* L. seed: cyto-histological and phytochemical analyses. *Frontiers in Plant Science*, 10, 454587. www.frontiersin.org

Chen, Z., Zhong, B., Barrow, C., Dunshea, F., & Suleria, H. (2021). Identification of phenolic compounds in Australian grown dragon fruits by LC-ESI-QTOF-MS/MS and determination of their antioxidant potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(6), 103151. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2021.103151>

Coyago-Cruz, E. (2017). *Estudio sobre el contenido en carotenoides y compuestos fenólicos de tomates y flores en el contexto de la alimentación funcional.*

Universidad de Sevilla, Departamento de Ciencias Agroforestales.

Coyago-Cruz, E., Corell, M., Moriana, A., Hernanz, D., Benítez-González, A. M., Stinco, C. M., & Meléndez-Martínez, A. J. (2018). Antioxidants (carotenoids and phenolics) profile of cherry tomatoes as influenced by deficit irrigation, ripening and cluster. *Food Chemistry*, 240(August 2017), 870–884.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.028>

Coyago-Cruz, E., Corell, M., Stinco, C., Hernanz, D., Moriana, A., & Meléndez-Martínez, A. (2017). Effect of regulated deficit irrigation on quality parameters, carotenoids and phenolics of diverse tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.). *Food Research International*, 96, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.026>

Coyago-Cruz, E., Guachamin, A., Vera, E., Moya, M., Heredia-Moya, J., & Beltrán, E. (2023). Physicochemical characteristics and antioxidant capacity of Ecuadorian paramo flowers. *Bionatura*, 8(1). <https://doi.org/10.21931/RB/2023.08.01.21>

Coyago-Cruz, E., Guachamin, A., Villacís, M., Rivera, J., Neto, M., Méndez, G., Heredia-Moya, J., & Vera, E. (2023). Evaluation of bioactive compounds and antioxidant activity in 51 minor tropical fruits of Ecuador. *Foods*, 12(24), 1–31.

<https://doi.org/10.3390/FOODS12244439>

Coyago-Cruz, E., Meléndez, A. J., Moriana, A., Girón, I. F., Martín, M., Galindo, A., López, D., Torrecillas, A., Beltrán, E., & Corell, M. (2019). Yield response to regulated deficit irrigation of greenhouse cherry tomatoes. *Agricultural Water Management*, 213(October 2018), 212–221.

<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.10.020>

Coyago-Cruz, E., Valenzuela, D., Guachamin, A., Méndez, G., Heredia-Moya, J., & Vera, E. (2024). Bioactive compound profiling and antioxidant activity of *Phytelephas tenuicaulis* and other amazonian fruits. *Foods*, 13(13), 1–15.

<https://doi.org/10.3390/foods13132151>

Coyago, E., Corell, M., & Meléndez, A. (2017). Estudio sobre el contenido en carotenoides y compuestos fenólicos de tomates y flores en el contexto de la alimentación Funcional. *Punto Rojo Libros*, 243.

Crupi, P., Faienza, M., Naeem, M., Corbo, F., Clodoveo, M., & Muraglia, M. (2023). Overview of the potential beneficial effects of carotenoids on consumer health and well-being. *Antioxidants*, 12(5), 12.

<https://doi.org/10.3390/ANTIOX12051069>

De Abreu, V., Alves, R., Silva, S., Ferro, J., Domingues, D., Miranda, V., & Varani, A. (2023). Comparative analyses of *Theobroma cacao* and *T. grandiflorum* mitogenomes reveal conserved gene content embedded within complex and plastic structures. *Gene*, 849, 146904.

<https://doi.org/10.1016/J.GENE.2022.146904>

Edo, G. I., Samuel, P. O., Oloni, G. O., Ezekiel, G. O., Onoharigho, F. O., Oghenegueke, O., Nwachukwu, S. C., Rapheal, O. A., Ajokpaoghene, M. O., Okolie, M. C., Ajakaye, R. S., Ndudi, W., & Igbodo, P. C. (2023). Review on the Biological and Bioactive components of Cocoa (*Theobroma Cacao*). Insight on Food, Health and Nutrition. *Natural Resources for Human Health*, 3(4), 426–448.

<https://doi.org/10.53365/NRFHH/174302>

Febrianto, N., & Zhu, F. (2022). Comparison of bioactive components and flavor volatiles of diverse cocoa genotypes of *Theobroma grandiflorum*, *Theobroma*

- bicolor, *Theobroma subincanum* and *Theobroma cacao*. *Food Research International*, 161, 111764. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111764>
- Gálvez, L. ., Reyes, A. ., Avendaño, C. ., Hernández, E., Mendoza, A., & Díaz, V. H. (2016). Pataxte (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.): especie subutilizada en México. *Agroproductividad*, 9(1), 41–47.
- García-Mogollon, C., Alvis-Bermudez, A., & Dussán-Sarria, S. (2017). Validación del método de microondas para determinar humedad en ñame espino (*Dioscorea rotundata* Poir). *Informacion Tecnologica*, 28(2), 87–94. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000200010>
- García Torres, D. E., Assuncao, D., Mancini, P., Pavan Torres, R., & Macini-Filho, J. (2002). Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 278–281.
- Guija, H., & Guija, E. (2023). Radicales libres y sistema antioxidante. *Horizonte Médico (Lima)*, 23(2), e2158–e2158. <https://doi.org/10.24265/HORIZMED.2023.V23N2.12>
- Hagos, M., Redi-Abshiro, M., Chandravanshi, B., & Yaya, E. (2022). Development of analytical methods for determination of β -carotene in Pumpkin (*Cucurbita maxima*) flesh, peel, and seed powder samples. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2022(1), 9363692. <https://doi.org/10.1155/2022/9363692>
- Happiest Plants. (2025). *Cacai Live Plants - Green Delight for Your Indoor Oasis – HappiestPlants*. <https://happiestplants.com/products/cacai-live-plants-theobroma-speciosum>
- Hernández, M., Casas, A., Martínez, O., & Galvis, J. (1998). Caracterización fisicoquímica y fisiológica del fruto de maraco (*Theobroma bicolor* H.B.K.) durante su desarrollo. *Agronomía Colombiana*, 15(2), 172–180. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/34295>
- Ismail, M., & Gögüs, F. (2023). *The effect of drying on the physical and chemical properties of fruits*. https://www.researchgate.net/publication/378031713_THE_EFFECT_OF_DRYING_ON_THE_PHYSICAL_AND_CHEMICAL_PROPERTIES_OF_FRUITS/citation/download

- ISO-874:1998. (1998). Fresh fruits and vegetables - sampling. *International Standard ISO*.
- ISO 1842. (2000). Fruits, vegetables and derived products-Sampling and methods of test. Part 5: Determination of pH. *East African Standard*, 5, 12.
<https://www.iso.org/standards.html>
- ISO 5520. (1981). Fruits, vegetables and derived products- Determination of alkalinity of total ash and of water-soluble ash. *International Standard ISO*, 1, 13.
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/279d9af0-297e-4e4c-9dd6-d85feb109def/iso-5520-1981>
- Jia, D., Liao, G., Ye, B., Zhong, M., Huang, C., & Xu, X. (2024). Changes in fruit quality, phenolic compounds, and antioxidant activity of kiwifruit (*Actinidia eriantha*) during on-vine ripening. *LWT*, 206, 116564.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2024.116564>
- Kolap, R., Kakade, P., Mankar, G., Barmukh, R., Gacche, R., & Zimare, S. (2022). Bioprospection of underutilized wild *Cissus woodrowii* fruits for nutritional value and characterization of green-extracted antioxidant phenolic compounds. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 29, 100371.
<https://doi.org/10.1016/J.JARMAP.2022.100371>
- Lanaud, C., Vignes, H., Utge, J., Valette, G., Rhoné, B., Mariella, G., Angarita, N., Fouet, O., Gaikwad, N., Zarrillo, S., Powis, T., Cyphers, A., Valdez, F., Olivera, S. Q., Speller, C., Blake, M., Valdez, F. J., Raymond, S., Rowe, S. M., ... Argout, X. (2024). A revisited history of cacao domestication in pre-Columbian times revealed by archaeogenomic approaches. *Scientific Reports*, 14(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1038/s41598-024-53010-6>
- Lucas, B., Dalla, F., Boeira, C., Verruck, S., & Da Rosa, C. (2022). Determination of total phenolic compounds in plant extracts via Folin-Ciocalteu's method adapted to the usage of digital images. *Food Science and Technology*, 42, e35122.
<https://doi.org/10.1590/FST.35122>
- Macías, R., Guerra, G., Cunuhay, J., Santana, J., & Jiménez, W. (2023). Comparación de producción de seis variedades de cacao (*Theobroma cacao*) en el centro

- experimental Sacha Wiwa. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(3), 8112–8123. https://doi.org/10.37811/CL_RCM.V7I3.6804
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1. <https://doi.org/10.1007/S11418-019-01364-X>
- Mar, J., Da Silva, L., Moreira, W., Biondo, M., Degaut, F., Campos, F., Kinupp, V., Campelo, P., Sanches, E., & Bezerra, J. (2021). Edible flowers from *Theobroma speciosum*: Aqueous extract rich in antioxidant compounds. *Food Chemistry*, 356, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129723>
- Mejía-Reyes, J., García-Cabrera, K., Velázquez-Ovalle, G., & Vázquez-Ovando, A. (2022). Capacidad antioxidante: conceptos, métodos de cuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 9(1), 9–33. <https://doi.org/10.23850/24220582.4023>
- Mohanta, B., Sen, D., Mahanti, B., & Nayak, A. K. (2023). Recent advances in the extraction, purification, and antioxidant activities of fruit polysaccharides: A review. *Food Hydrocolloids for Health*, 4, 100163. <https://doi.org/10.1016/J.FHFH.2023.100163>
- Montero, M., Contreras, J., Carrillo, M., Aponte, P., González, D., & Aponte, G. (2024). *Fichas técnicas de especies de uso forestal y agroforestal de la Amazonia Colombiana*. https://sinchi.org.co/files/PUBLICACIONES DIGITALES/Fichas Tecnicas agroforestal/Fichas Tecnicas de Especies de uso Forestal y Agroforestal de la Amazonia Colombiana_27 COPOAZU.pdf
- Moreira, J., Queiroz, E., Frota, R., Campelo, P., Sanches, E., & De Araújo, J. (2024). *Theobroma spp.*: A review of it's chemical and innovation potential for the food industry. *Food Chemistry Advances*, 4, 100683. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHA.2024.100683>
- Munekata, P. E. S., Pateiro, M., Domínguez, R., Nieto, G., Kumar, M., Dhama, K., & Lorenzo, J. M. (2023). Bioactive compounds from fruits as preservatives. *Foods* 2023, Vol. 12, Page 343, 12(2), 343. <https://doi.org/10.3390/FOODS12020343>
- Munteanu, I., & Apetrei, C. (2021). Analytical methods used in determining antioxidant

activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3380.

<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>

Murillo, S., Ponce, F., & Huamán, M. (2020). Características fisicoquímicas, compuestos bioactivos y contenido de minerales en la harina de cáscara del fruto de cacao (*Theobroma cacao* L.). *Manglar*, 17(1), 67–73.

<https://doi.org/10.17268/MANGLAR.2020.011>

Nambi, R., Prashanth, J., Nandini, M., Khan, P., & Basha, P. (2024). Characterization of a novel high β -carotene content (Hbc) mutant of *Solanum lycopersicum*. *South African Journal of Botany*, 166, 181–190.

<https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2024.01.024>

Naz, T., Ullah, S., Nazir, Y., Li, S., Iqbal, B., Liu, Q., Mohamed, H., & Song, Y. (2023). Industrially important fungal carotenoids: advancements in biotechnological production and extraction. *Journal of Fungi 2023*, Vol. 9, Page 578, 9(5), 578.

<https://doi.org/10.3390/JOF9050578>

NTE-INEN-1750. (2012). Norma de hortalizas y frutas frescas. Muestreo. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 1, 19. http://www.normalizacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/11/nte_inen_0980.pdf

NTE-INEN-1751:96. (2012). Frutas frescas. Definiciones y clasificación. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 1, 10.

<https://es.scribd.com/document/440903071/NTE-INEN-111>

NTE-INEN-177. (1995). Cacao en grano - muestreo. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*. <https://www.anecacao.com/normasdecalidad/inen177.pdf>

NTE-INEN-1953. (2012). Gelatina pura comestible. Determinación de la pérdida por calentamiento. *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 1(1), 6.

<https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/1953-C.pdf>

NTE-INEN-ISO-1842. (2020). Productos vegetales y de frutas – determinación de pH (IDT). *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 2, 5.

<https://www.normalizacion.gob.ec/>

NTE-INEN-ISO-2171:2013. (2020). Cereales, leguminosas y subproductos.

Determinación del rendimiento de ceniza por incineración (IDT). *Servicio*

Ecuadoriano de Normalización, 3, 6.

https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/nte_inen_iso_10381_3_extrato.pdf

NTE-INEN-ISO-2173:2013. (2013). Productos vegetales y frutas - determinación de sólidos solubles - método refractométrico (IDT). *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 1, 2–5. <https://www.normalizacion.gob.ec/>

NTE-INEN-ISO-750:2013. (2013). Productos vegetales y de frutas- determinación de la acidez titulable (IDT). *Instituto Ecuatoriano De Normalización*, 1. https://www.academia.edu/36881948/NORMA_TÉCNICA_ECUATORIANA_NTE_INEN_ISO_750_2013_PRODUCTOS_VEGETALES_Y_DE_FRUTAS_DETERMINACIÓN_DE_LA_ACIDEZ_TITULABLE_IDT_Primer_Edición

NTE INEN 2337. (2008). NTE INEN 2337 (Jugos, pulpas las, concentrados, néctares, bebidas de frutas y vegetales). *Instituto Ecuatoriano de Normalización*, 2337. <https://dn790005.ca.archive.org/0/items/ec.nte.2337.2008/ec.nte.2337.2008.pdf>

Pérez, A., Hernández, C., Romero, H., & Valencia, R. (2019). *Herrania nitida*. Árboles Emblemáticos de Yasuní, Ecuador. [https://bioweb.bio/floraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Herrania nitida](https://bioweb.bio/floraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Herrania%20nitida)

POWO. (2024). *Theobroma L*. Royal Botanic Gardens. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30005713-2>

Quiroz, C., & Aguilar, M. (2022). Continuous ultrasound and pulsed ultrasound: Selective extraction tools to obtain enriched antioxidants extracts from cocoa beans (*Theobroma cacao L.*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 80, 103095. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2022.103095>

Ravimannan, N., & Nisansala, A. (2017). Study on antioxidant activity in fruits and vegetables – A Review. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences (IJARBS)*, 4(3), 93–101. <https://doi.org/10.22192/IJARBS.2017.04.03.010>

Salto, L., Muniyandi, K., Porat, R., Goldenberg, L., Carmi, N., & Maoz, I. (2024). Bitterness and flavanone composition of ‘Redson’ fruit: A new red-fleshed pomelo × grapefruit hybrid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 133, 106366. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2024.106366>

- Santacruz, S., & Mantuano, W. (2021). Efecto del procesamiento de cacao negro en el contenido y actividad antioxidante de compuestos fenólicos. *Revista ESPAMCIENCIA ISSN 1390-8103*, 12(1), 41–45.
https://doi.org/10.51260/REVISTA_ESPAMCIENCIA.V12I1.221
- Santos, R., Pires, J., & Correa, R. (2012). Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma L.* species. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 59(3), 327–345. <https://doi.org/10.1007/S10722-011-9685-6/FIGURES/4>
- Semmar, N. (2024). Phenolic compounds. In *Secondary Metabolites in Plant Stress Adaptation: Analytic Space of Secondary Metabolites* (pp. 45–70). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-52595-7_4
- Siddeeg, A., AlKehayez, N. M., Abu-Hiamed, H. A., Al-Sanea, E. A., & AL-Farga, A. M. (2021). Mode of action and determination of antioxidant activity in the dietary sources: An overview. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1633–1644.
<https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.11.064>
- Singh, M., Agarwal, S., Agarwal, M., & Rachana. (2020). Benefits of *Theobroma cacao* and its phytochemicals as cosmeceuticals. *Plant-Derived Bioactives: Production, Properties and Therapeutic Applications*, 509–521. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1761-7_21
- Smith, N. (2023). *Amazon fruits: An ethnobotanical Journey*.
https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=yoTZEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&dq=Amazon+Fruits:+An+Ethnobotanical+Journey&ots=6uhGwDaU0k&sig=rgKLLWCnuTs8kRbKa7amrzflxXQ&redir_esc=y#v=onepage&q=Amazon+Fruits%3A+An+Ethnobotanical+Journey&f=false
- Soares, T., & Oliveira, M. (2022). Cocoa by-products: characterization of bioactive compounds and beneficial health effects. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1625, 27(5), 1625. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27051625>
- Stra, A., Almarwaey, L., Alagoz, Y., Moreno, J., & Al-Babili, S. (2023). Carotenoid metabolism: New insights and synthetic approaches. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1072061. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.1072061/BIBTEX>

- Toaquiza, V. (2022). *Principales componentes químicos asociados a la calidad de materiales seleccionados de cacao ecuatoriano* [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/17571>
- Tropicos.org. (2024a). *Cacao - Theobroma cacao L.* Missouri Botanical Garden. <https://www.tropicos.org/name/30400642>
- Tropicos.org. (2024b). *Theobroma*. Missouri Botanical Garden. <https://www.tropicos.org/name/Search?name=theobroma>
- US-ISO-2173. (2009). Fruit and vegetable products. Determination of soluble solids. Refractometric method. *International Organization for Standardization*, 2, 17. <https://www.iso.org/standards.html>
- US-ISO-750. (2009). Fruit and vegetable products — Determination of titratable acidity. *International Organization for Standardization*, 2, 11. <https://www.iso.org/standards.html>
- Veintimilla, K. (2020). *Estudio de los compuestos bioactivos de hojas de cacao (Theobroma cacao L.) (Nacional, forastero, trinitario) en dos estados fisiológicos foliares* [UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO]. <https://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/6580>
- Vera, J., Vásquez, L., Zapata, K., & Rodríguez, S. (2024). Caracterización morfológica, fisicoquímica y microbiológica del cacao Macambo (*Theobroma bicolor* Humb & Bonpl.) en Ecuador. *Revista Agrotecnológica Amazónica*, 4(2), e657–e657. <https://doi.org/10.51252/RAA.V4I2.657>
- Villacís, M. (2022). *Caracterización físico-química, funcional y actividad antioxidante de diecisiete frutos comercializados en mercados locales de la Amazonía ecuatoriana* [Universidad Politécnica Salesiana]. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/26725>
- WFO. (2024). *Theobroma L. Genus*. <https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-4000038157-2024-06?page=1>
- Yanzapanta, A. (2014). *Estudio de la variación de los contenidos de polifenoles totales, alcaloides y grasa en almendras de cacao fino de aroma en tres diferentes zonas de producción de la amazonía ecuatoriana*.

<https://repositorio.uta.edu.ec:8443/jspui/handle/123456789/8467>

Zhang, Y., Cai, P., Cheng, G., & Zhang, Y. (2022). A brief review of phenolic compounds identified from plants: their extraction, analysis, and biological activity. *Natural Product Communications*, 17(1), 1–14.

<https://doi.org/10.1177/1934578X211069721>