



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

***Estudio del potencial nutracéutico de dos frutos
amazónicos del sistema agroforestal chakra***

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: BRYAN ALEXANDER LOJA OJEDA

TUTORA: PhD. ZULAY MARINA NIÑO RUIZ

CO-TUTOR: PhD. PABLO ANDRÉS CISNEROS

Napo-Ecuador

2022

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 23 de febrero de 2023

Yo, Bryan Alexander Loja Ojeda con documento de identidad N°0923665574, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,

Atentamente,

Firma:

A handwritten signature in blue ink that reads "Bryan Loja." The signature is stylized with a large loop at the beginning and a trailing flourish.

Bryan Alexander Loja Ojeda

0923665574

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, Bryan Alexander Loja Ojeda con documento de identidad N° 0923665574, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Estudio del potencial nutracéutico de dos frutos amazónicos del sistema agroforestal chakra”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación superior.

Tena, 23 de febrero de 2023

Firma



Bryan Alexander Loja Ojeda

0923665574

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: “Estudio del potencial nutracéutico de dos frutos amazónicos del sistema agroforestal chakra”, en la modalidad de: tesis, fue realizado por: Bryan Alexander Loja Ojeda, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 23 de febrero de 2023

Firma:



.....
Zulay Marina Niño Ruiz

C.I: 1757560303

Firma:



Firmado electrónicamente por:
**PABLO ANDRES
CISNEROS PEREZ**

.....
Pablo Andrés Cisneros

C.I: 1003237177

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a Dios y a la vida por haberme permitido llegar a cumplir una etapa más en mi formación profesional. Agradecer a todas esas personas especiales que siempre han creído en mí y me han apoyado como lo son mis padres y familia en general.

A mis tutores, agradecer por su apoyo constante y sus aportes al presente trabajo. A la Universidad agradecer por permitirme conocer excelentes docentes y poder formar parte del proyecto que derivó en mi presente trabajo. Una mención especial para esa gran profesional y amiga que llegue tener en el laboratorio como lo fue Roxana Llive (Roxy), así como a todos esos amigos y compañeros que compartimos muchas anécdotas en el laboratorio como Belén Macas (Belencita), Mikaela Jiménez (Mika), Lisbeth Encalada (Liss), Roberth Reyes, Joel Medina (El Evencio) y mi hermano Steven Loja.

Finalmente, agradecer a todas esas personas especiales que durante mi trayecto universitario han estado en las buenas y en las malas, como lo son Belén Benites, Andrea Cedeño, Samy Roldan y Bryan Zurita.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis queridos padres, Alejandro Loja y María Ojeda por su apoyo incondicional durante mi trayectoria universitaria. Y una mención especial hasta el cielo, a la memoria de mi tío Jorge Loja, quién fue, es y será una inspiración y motivación en mi vida.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-12. Estructura básica de los flavonoides y sus clases.	15
Figura 2-12. Estructura química de los ácidos fenólicos y sus derivados.	16
Figura 3-12. Grupos estructurales para la eliminación de radicales libres.....	17
Figura 4-12. Reacción entre el radical DPPH• y un antioxidante para formar.....	19
Figura 5-12. Oxidación de ABTS con persulfato de potasio.....	19
Figura 6-12. Formación del complejo Fe^{2+} -TPTZ a partir del complejo Fe^{3+} -TPTZ con un agente antioxidante.....	20
Figura 7-12. Correlación entre el contenido fenólico total y el % de inhibición del radical DPPH.....	47
Figura 8-12. Correlación entre el contenido de flavonoides totales y el % de inhibición del radical DPPH.	48
Figura 9-12. Correlación entre el contenido fenólico total y el % de inhibición del radical ABTS.	49
Figura 10-12. Correlación entre el contenido de flavonoides totales y el % de inhibición del radical ABTS.....	50
Figura 11-12. Correlación entre el contenido de fenoles totales y el poder férrico reductor/antioxidante (FRAP).....	51
Figura 12-12. Correlación entre el contenido de flavonoides totales y el poder férrico reductor/antioxidante (FRAP).....	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-11: Rendimiento de extracción de la cáscara, pulpa y semilla del cacao blanco y pasu.....	31
Tabla 2-11: Contenido fenólico total en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco y pasu.....	32
Tabla 3-11: Contenido de flavonoides totales en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco y pasu.....	33
Tabla 4-11: Contenido de catequina y epicatequina en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco.....	34
Tabla 5-11: Contenido de antocianinas en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco.	35
Tabla 7-11: Actividad antioxidante (DPPH, ABTS) en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco y pasu.....	37
Tabla 8-11: Poder antioxidante por reducción férrica (FRAP) de cáscara, pulpa y semilla del cacao blanco y pasu.....	37
Tabla 9-11: Determinación de la IC50 de los extractos de cacao blanco y pasu.....	38
Tabla 10-11: Contenido de cafeína y teobromina en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco.....	39
Tabla 11-11: Metabolitos tentativamente identificados en los extractos de cacao blanco y pasu por UPLC-ESI-QTOF-MS.....	41

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1-2: Extractos metanólicos de cacao blanco y pasu, obtenidos mediante los métodos de extracción y sonicación.....	54
Anexo 2-2: Obtención de los extractos metanólicos.....	54

RESUMEN

El presente trabajo caracterizó la actividad antioxidante y el perfil fenólico de la cáscara, la pulpa y la semilla de frutas presentes en chakras kichwas de la provincia de Napo, tales como: el pasu (*Gustavia macarenensis* Philipson) y cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.). Los compuestos fenólicos se extrajeron utilizando técnicas de extracción por agitación y por sonicación. Para cada técnica de extracción, se determinó el contenido total de fenoles y flavonoides, y la actividad antioxidante por medio de la eliminación de radicales DPPH, ABTS y de potencia de actividad reductora férrica (FRAP). El perfil fenólico de los extractos obtenidos también se caracterizó por cromatografía líquida (UPLC/ESI-QTOF-MS). Las cáscaras del cacao blanco y del pasu presentaron el mayor contenido fenólico total ($84,41 \pm 0,04$ y $98,51 \pm 0,33$ μg EAG/mg de ext, respectivamente), de flavonoides totales ($1,06 \pm 0,06$ y $1,77 \pm 0,18$ μg EQ/mg de ext, respectivamente), % de inhibición del radical DPPH ($70,90 \pm 2,43$ y $75,30 \pm 3,11$ %, respectivamente), % de inhibición del radical ABTS ($74,05 \pm 0,63$ y $99,44 \pm 0,35$ %, respectivamente) y poder antioxidante por reducción férrica (FRAP) ($2,58 \pm 0,17$ y $5,46 \pm 0,29$ mmoles Fe^{2+} /g extracto, respectivamente). El análisis UPLC/ESI-QTOF-MS reveló una variedad de metabolitos como alcaloides fenólicos, lignanos, flavonas, ácidos hidroxicinámicos, que registran actividad antioxidante. Este trabajo revela el potencial nutracéutico de las cáscaras frutales para aplicaciones alimentarias y farmacéuticas.

Palabras claves: actividad antioxidante, pasu (*Gustavia macarenensis* Philipson), cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.), perfil fenólico, potencial nutracéutico

ABSTRACT

The present work characterized the antioxidant activity and the phenolic profile of the peel, pulp, and seed of fruits present in Kichwa chakras from the province of Napo, such as pasu (*Gustavia macarenensis* Philipson) and cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.). Phenolic compounds were extracted using shaking and sonication extraction techniques. For each extraction technique, the total content of phenols and flavonoids, and the antioxidant activity by DPPH radical scavenging activity, ABTS and iron reducing activity potency (FRAP) were determined. The phenolic profile from the obtained extracts was also characterized by liquid chromatography (UPLC/ESI-QTOF-MS). The peels of cacao blanco and pasu presented the highest total phenolic content (84.41 ± 0.04 and 98.51 ± 0.33 μg EAG/mg of ext, respectively), of total flavonoids (1.06 ± 0.06 and 1.77 ± 0.18 μg EQ/mg ext, respectively), % DPPH radical inhibition (70.90 ± 2.43 and $75.30 \pm 3.11\%$, respectively), % ABTS radical inhibition (74.05 ± 0.63 and $99.44 \pm 0.35\%$, respectively) and antioxidant power by iron reduction (FRAP) (2.58 ± 0.17 and 5.46 ± 0.29 mmoles Fe^{2+} / g ext, respectively). UPLC/ESI-QTOF-MS analysis revealed a variety of metabolites such as phenolic alkaloids, lignans, flavones and hydroxycinnamic acids, which show antioxidant activity. This work reveals the nutraceutical potential of fruit peels for food and pharmaceutical applications.

Keywords: antioxidant activity, pasu (*Gustavia macarenensis* Philipson), cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.), phenolic profile, nutraceutical potential

INDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	2
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA	5
INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS	7
INDICE DE ANEXOS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	
10	
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	12
1.1. Antecedentes.....	12
1.2. Planteamiento del problema a investigar	20
1.3. Justificación de la investigación	21
1.4. Objetivos de la Investigación	23
1.4.1. Objetivo General.....	23
1.4.2. Objetivos Específicos.....	23
CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO	24
2.1. Preparación de muestras de extracto en metanol.....	24
2.2. Ensayo de inhibición del radical DPPH	24
2.3. Ensayo de decoloración del catión radical ABTS.....	25
2.4. Ensayo de poder antioxidante por reducción férrica (FRAP)	26
2.5. Contenido fenólico total	27
2.6. Contenido de flavonoides totales	27
2.7. Contenido de antocianinas.....	28
2.9. Cuantificación de teobromina, cafeína, catequina y epicatequina en cacao blanco por RP-HPLC.....	29
2.10. Análisis Estadístico.....	30
CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS	30
3.1. Extractos metanólicos	30
3.2. Contenido fenólico total	31
3.4. Contenido de Antocianinas	34
3.5. Ensayos de actividad antioxidante.....	35
3.7. Identificación de compuestos en los extractos metanólicos del cacao blanco y pasu	40
CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN	43
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
REFERENCIAS	
ANEXOS	

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Antecedentes

La diversidad biológica del Ecuador es reconocida mundialmente [1] y tiene un potencial inherente que debe ser aprovechado para la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas [2], nutraceuticos y/o fármacos. Las distintas especies vegetales del Ecuador pueden ser estudiadas para el análisis de algún tipo de actividad biológica, por su contenido de metabolitos secundarios [3]. Esto debido a que estas especies vegetales se encuentran en una zona donde predomina el clima tropical y subtropical. Ecuador es un país sudamericano con apenas 280.000 Km cuadrados [3], en el cual existen más de 17 000 especies de plantas vasculares registradas de las cuales, en su gran mayoría son angiospermas [4]. Esto como resultado de una alta diversidad ecológica y étnica, y de los numerosos intercambios e influencias históricas [4].

En la Región Amazónica, los frutales forman parte de la diversidad de cultivos que se encuentran en los sistemas de producción denominados “chakra” [5]. En este sistema agroforestal tradicional podemos encontrar arboles de tamaño medio pertenecientes al género *Gustavia* (*Gustavia macarenensis* Philipson) y *Theobroma* (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.). Estas especies arbóreas se consideran semidomesticadas, resultado de la evolución fitogenética, producto de la manipulación humana y de la misma selección natural. Este proceso genera una diferenciación a nivel del fenotipo y genotipo de ciertas especies con relación a su población natural en estado silvestre [6,7]. El prefijo semi supone que la planta posee adaptabilidad ecológica para reproducirse y sobrevivir sin depender de los cuidados humanos. En general, las plantas domesticadas proveen la mayor parte de productos para la alimentación humana. Sin embargo, para las culturas indígenas y las poblaciones forestales, las plantas silvestres juegan un papel importante en la subsistencia de la región [4].

Gustavia macarenensis es un árbol que se maneja en estado silvestre [4] y también se maneja en las chakras. Es conocido por los pobladores de las distintas comunidades indígenas de la Amazonía con nombres como: iniák (shuar chicham), urku pasu, allyan pasu o simplemente pasu (kichwa). *G. macarenensis* se desarrolla a una altitud promedio de 260 m.s.n.m [8] y se encuentra distribuida la Amazonía Ecuatoriana en las provincias de Napo, Sucumbíos, Pastaza, Zamora Chinchipe, Morona Santiago y Orellana en los cantones de La Joya de los Sachas, Francisco de Orellana El Coca y

Loreto [9]. El fruto de *G. macarenensis* pesa en promedio 222,42 g y su fracción comestible corresponde al 62,31% [8]. Su fruto es consumido de manera cruda y cocida. Su mesocarpio tiene una textura suave y mantecosa, como la del aguacate, y un sabor similar al del maní [10]. La comunidad indígena utiliza la pulpa como purgante, la infusión de la corteza se usa para detener las hemorragias uterinas y las semillas frescas combaten la disentería y la sinusitis [10]. Además, se sabe que las plantas del género *Gustavia* poseen una elevada actividad antioxidante, que es usada por las poblaciones amazónicas para tratar enfermedades que ocasionan daño en la piel, la malaria y Leishmaniasis [8].

Theobroma bicolor es un árbol conocido por poblaciones indígenas de la Amazonía como *patas*, *killá* o cacao blanco [4,11]. El cacao blanco prospera en un entorno tropical cálido y húmedo hasta los 1000 m.s.n.m [12], se encuentra distribuido en la región amazónica en las provincias de Napo, Pastaza, Sucumbíos y Orellana [13]. De acuerdo a De la Torre et al.[4], el arilo crudo y las semillas fritas o tostadas son comestibles. Sus semillas tienen un alto valor nutritivo por su alto contenido en proteínas, grasas, carbohidratos y fibras, así como en cobre, magnesio, manganeso, potasio y zinc [11]. También, de las semillas se obtiene el cacao que se usa para preparar chocolates, cacao en polvo y bombones [4]. La corteza es utilizada para eliminar parásitos intestinales y tratar la diarrea [4,14]. Además, se sabe que las plantas del género *Theobroma* poseen actividad antioxidante, inducida por los ácidos fenólicos y flavonoides; los cuáles tienen posibles efectos beneficiosos para la salud [15]. Así mismo, estas plantas poseen otros compuestos químicos de interés como las metilxantinas (Teobromina y cafeína), que se asocian con algunos efectos fisiológicos en varios sistemas del cuerpo [16].

Algunas frutas amazónicas no sólo son comestibles sino que son potencialmente funcionales con una variedad de compuestos químicos beneficiosos para la salud [17]. Hay muchas razones biológicamente plausibles para esta asociación potencialmente protectora, principalmente que muchos de los fitoquímicos actúan como anticancerígenos, inmunomoduladores y antioxidantes [18]. Los antioxidantes actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres como las especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales generan estrés oxidativo [19–22]. El estrés oxidativo, se define como el desequilibrio existente entre los compuestos oxidantes y los antioxidantes, siendo el exceso de los oxidantes en el organismo; la causa del envejecimiento y otras enfermedades del tipo neurodegenerativas, cardiovasculares y

el cáncer principalmente [21,23]. Los antioxidantes se pueden clasificar en dos grupos [24–26]: Naturales y Sintéticos. En cuanto a los antioxidantes naturales, el sistema antioxidante humano se divide en antioxidantes enzimáticos y no-enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos se constituyen de tres enzimas relevantes como la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y otras enzimas como glutatión reductasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Entre los antioxidantes no-enzimáticos endógenos podemos encontrar algunas vitaminas (A), cofactores enzimáticos (Q10), compuestos nitrogenados (ácido úrico) y péptidos (glutatión). A pesar de su notable eficacia, el sistema antioxidante endógeno no es suficiente, y el ser humano depende de diversos tipos de antioxidantes presentes en la dieta para mantener las concentraciones de radicales libres en niveles bajos. Y entre los antioxidantes no-enzimáticos exógenos tenemos la quercetina, catequina (flavonoides), ácido gálico, ácido ferúlico (ácidos fenólicos), vitaminas C y E, licopeno (carotenoide), algunos minerales como el zinc y selenio entre otros. Finalmente, entre los antioxidantes sintéticos, los cuales son utilizados en la conservación de alimentos, se encuentran los ésteres del ácido gálico o los sinérgicos butilhidroxianisol (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) y quelantes de metales de transición como el EDTA.

La actividad antioxidante es de los beneficios más conocidos por los compuestos químicos presentes en las frutas [18,22]. Los compuestos fenólicos son el grupo más numeroso de compuestos fitoquímicos con actividad antioxidante [18,21]. Esta actividad se atribuye por su estructura que contiene grupos hidroxilos unidos a estructuras de anillo y actúan como agentes reductores, donadores de hidrógeno, eliminadores de radicales libres y quelantes de metales [18,27]. Los compuestos fenólicos incluyen ácidos fenólicos, flavonoides (flavonoles, flavonas, flavanoles, flavanonas y antocianinas), estilbenos y lignanos, de los cuales los flavonoides y los ácidos fenólicos son los compuestos fenólicos más abundantes en la dieta, representando el 60% y el 30%, respectivamente [18,28]. Además, estos compuestos químicos son los responsables del color y características sensoriales de las frutas [29]. Entonces, se cree que el efecto beneficioso para la salud proveniente de las frutas, puede atribuirse principalmente al número de compuestos fenólicos y a su capacidad para promover el efecto antioxidante [30]. Por ende, se cree que a mayor contenido de compuestos fenólicos en las frutas, exhiben mayor actividad antioxidante.

Los compuestos fenólicos son una clase de compuestos orgánicos que se encuentran en frutas y constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios [31,32].

Se clasifican en dos grupos principales [27]: flavonoides y polifenoles no flavonoides. Los polifenoles del tipo flavonoides contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico (C6-C3-C6), dos anillos de seis miembros unidos con una unidad de tres carbonos que puede o no ser parte de un tercer anillo [32]. Los flavonoides se pueden subdividir en diferentes subgrupos según el patrón de sustitución del carbono del anillo C al que se une el anillo B y el grado de insaturación y oxidación del anillo C [33], es decir, el enlace doble 2,3, el 3-OH, el grupo 4-ceto y el catión flavilio [34]. Los flavonoides en los que el anillo B está enlazado en la posición 3 del anillo C se denominan isoflavonas. Aquellos en los que el anillo B está enlazado en la posición 2 pueden subdividirse en varios subgrupos sobre la base de las características estructurales del anillo C. Estos subgrupos son [27,33] Figura 1: flavonoles, flavonas, flavanonas, flavan-3-oles o catequinas, antocianinas (catión flavilio). Además, el grado y el patrón de las reacciones de hidroxilación, prenilación, alcalinización o glicosilación modifican la estructura primaria de la molécula, lo cual se correlaciona con las correspondientes propiedades biológicas y/o químicas y biodisponibilidad [35].

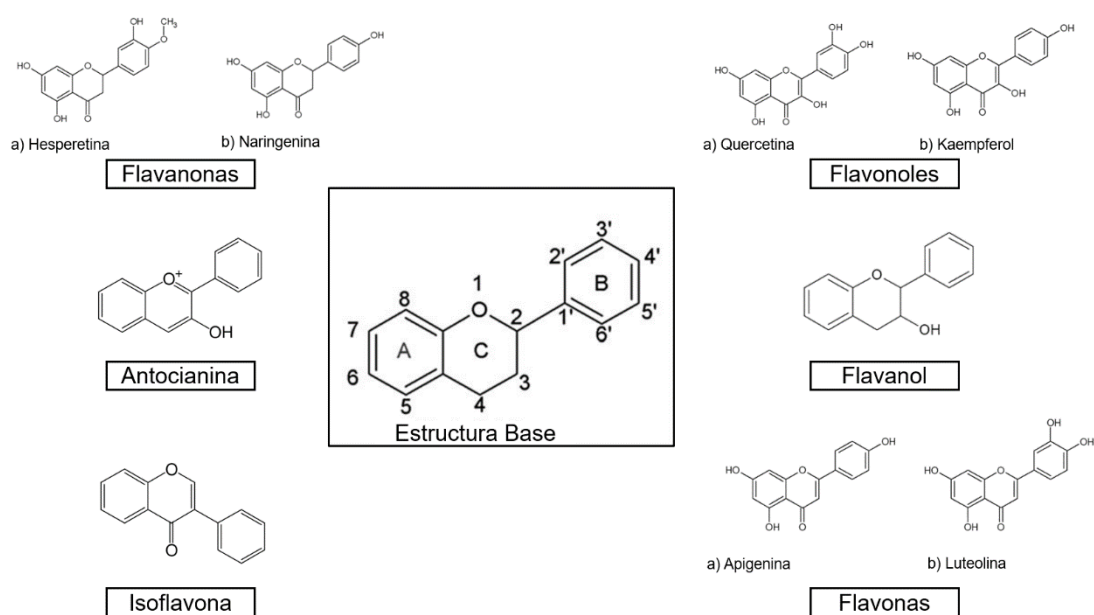


Figura 1-12. Estructura básica de los flavonoides y sus clases.
Realizado por: Loja Bryan, 2022

En el grupo de los no flavonoides podemos encontrar subclases como [28,35]: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos y taninos. Los ácidos fenólicos se caracterizan por un grupo carboxilo unido al anillo de benceno. Se derivan de dos compuestos fenólicos principales, los ácidos benzoico y cinámico [35] Figura 2.

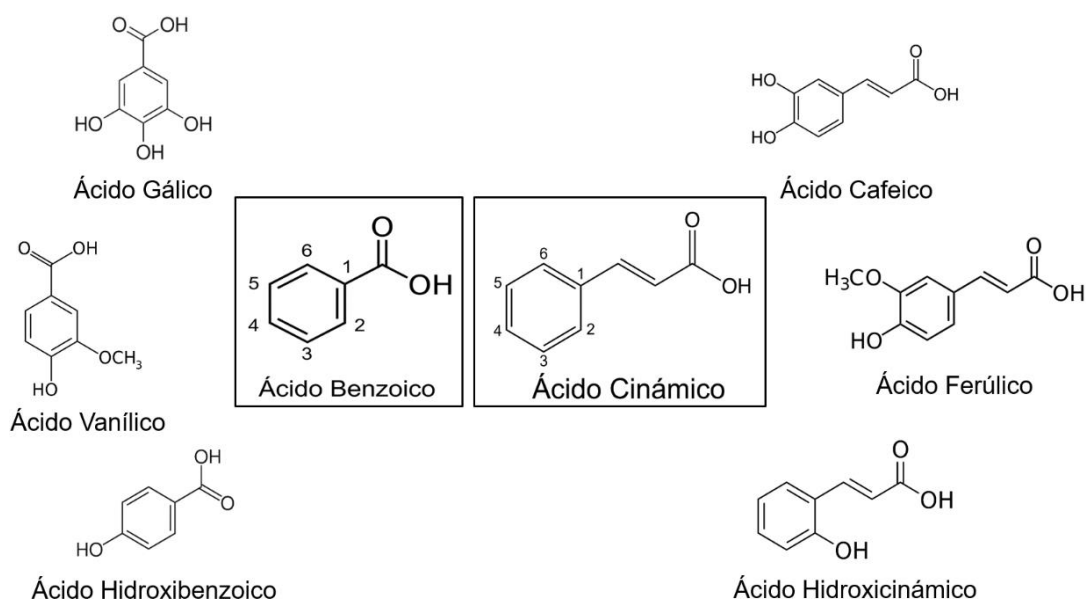


Figura 2-12. Estructura química de los ácidos fenólicos y sus derivados.
Realizado por: Loja Bryan, 2022

Los flavonoides pueden actuar como antioxidantes por varias vías potenciales [36]. Las principales características estructurales de los flavonoides necesarias para la eliminación eficaz de radicales se resumen en la figura 3 [37]: a) el grupo orto-dihidroxi o catecol en el anillo B, es el lugar objetivo de los radicales libres para todos los flavonoides con un enlace 2,3 saturado (flavan-3-oles, flavanonas, cloruro de cianidina). La fracción de catecol confiere una mayor estabilidad a los radicales aroxilo y participa en la deslocalización de electrones. (b) El doble enlace 2,3 en conjugación con el grupo 4-oxo, son responsables de la deslocalización de electrones del anillo B. (c) Los grupos 3- y 5- OH con el grupo 4-oxo, permiten la deslocalización de electrones desde el grupo 4-oxo a ambos sustituyentes potenciando la actividad captadora de radicales libres.

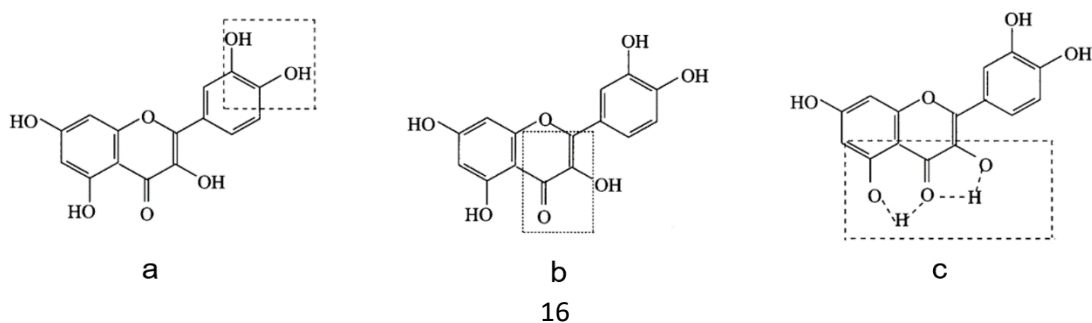
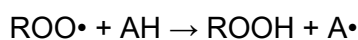
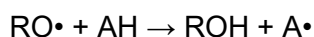
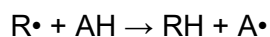


Figura 3-12. Grupos estructurales para la eliminación de radicales libres
Realizado por: Loja Bryan, 2022

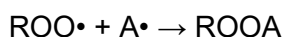
La actividad antioxidante de los ácidos fenólicos y sus ésteres están directamente relacionados por el número y la posición de los grupos hidroxilo en la molécula que se verían reforzados por impedimentos estéricos [38,39]. Además, los grupos metoxi y ácido carboxílico también tienen efectos importantes sobre la capacidad antioxidante de los ácidos fenólicos [39]. Así mismo, los ácidos fenólicos que poseen una estructura de tipo catecol, como el ácido cafeico, son buenos antioxidantes [36].

La determinación de la capacidad antioxidante en los productos naturales está influenciada por muchos factores, y del mismo modo no existe una metodología única que pueda utilizarse para reflejar todas las interacciones presentes en el proceso [40]. En general, los ensayos de capacidad antioxidante miden el efecto combinado de muchos antioxidantes presentes en la muestra, que son capaces de eliminar los radicales libres generados en los ensayos [41]. Entonces, para dilucidar un perfil completo de la capacidad antioxidante, se necesitan varios ensayos que evalúen la eficacia contra varias especies de radicales libres (especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno, etc.) [40,42]. Y así, tener en cuenta los diferentes modos de acción de un determinado antioxidante o grupo de antioxidantes.

Existen una variedad de ensayos utilizados para estimar las capacidades antioxidantes de las frutas, y estos se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción en [43]: ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT, por sus siglas en inglés) y en la transferencia de electrones individuales (SET, por sus siglas en inglés). La base del mecanismo de acción clásico de los antioxidantes se representa en las siguientes ecuaciones e indica que pueden transferir un átomo de hidrógeno (H•) y un electrón (e-) o ambos para inhibir los pasos de iniciación o propagación de los radicales [25,43].



Los radicales antioxidantes ($A\bullet$) producidos por este proceso son mucho menos reactivos que los radicales lipídicos o peroxílicos y, por lo tanto, no promueven la oxidación como lo hacen los radicales lipídicos o peroxílicos en el organismo. De hecho, estos radicales antioxidantes, pueden poner fin a la reacción de oxidación lipídica reaccionando con radicales peroxilo, radicales alcoxilo y otros antioxidantes como se representa en las siguientes ecuaciones [44]:



Entre los distintos ensayos (HAT/SET) encontramos [43,45], el ensayo del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), del radical 2,2'-azinobis (ácido 3-etilben-zotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), los cuales se basan en la eliminación del radical cromóforo estable. Otro ensayo, es el ensayo del poder férrico reductor (FRAP), el cual mide la capacidad de un antioxidante en la reducción de un oxidante, que cambia de color cuando se reduce.

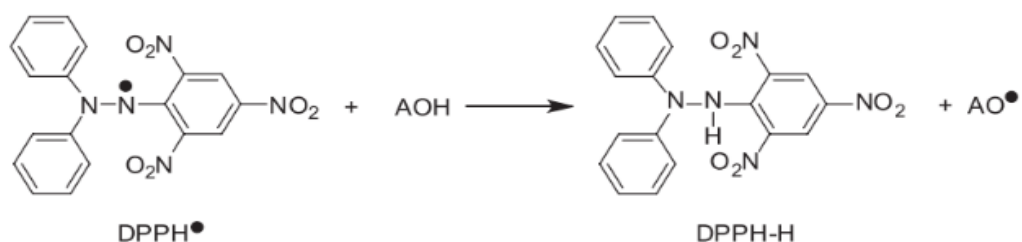
La determinación de la actividad antioxidante "total" emplea métodos objetivos y reproducibles. De manera tal, que ofrecen un enfoque útil a las industrias agroalimentarias y farmacéuticas para la evaluación, el desarrollo y el control de calidad de los productos. Este tipo de ensayos se caracterizan por ser sencillos, altamente sensibles y proporcionan resultados rápidos y reproducibles [44]. Los métodos que más se han aplicado en tecnología alimentaria implican la generación de radicales libres, fácilmente detectables mediante técnicas fluorimétricas o fotométricas, y su posterior desaparición por el antioxidante [43]. Entre los radicales estables más conocidos, el radical DPPH• en ensayo denominado "ensayo colorimétrico DPPH" es considerado una herramienta universal para la evaluación de la actividad antioxidante de compuestos individuales, en su mayoría de naturaleza fenólica [43]. Los antioxidantes como los fenoles (ácido Ferúlico, ácido gálico, trolox, quercetina) pueden eliminar radicales libres mediante la donación de átomos de hidrógeno Figura 4. Esto es posible debido al enlace relativamente débil que se forma entre el hidrógeno y el oxígeno. Así mismo, los fenoles pueden contribuir a la eliminación de radicales libres mediante la transferencia de electrones. Esto último continúa con una transferencia de protones o incluso puede ocurrir de manera concertada de modo que el mecanismo de la reacción presenta un modo mixto. En el ensayo del radical DPPH•, este muestra un máximo de absorción a

517 nm (púrpura). El color pasa de púrpura a amarillo seguido de la formación de DPPH-H al absorber el hidrógeno de un antioxidante [45,46].

Figura 4-12. Reacción entre el radical DPPH• y un antioxidante para formar DPPH-H [47].

Realizado por: Loja Bryan, 2022

Al igual que el ensayo DPPH, el ensayo del radical ABTS•+, se presenta un cromóforo estable con una absorción cromófora azul-verde, mediante la oxidación de ABTS con persulfato de potasio antes de la adición de antioxidantes Figura 5. Posterior a esto, existe una decoloración de catión radical ABTS [45,46]. El ensayo a ABTS se usa en la determinación de antioxidantes hidrofílicos tales como ácido ascórbico, β-caroteno, licopeno; así como antioxidantes lipofílicos de gran interés como los carotenoides,



tocoferoles, ácidos hidroxicinámicos (ácido caféico, ácido ferúlico, ácido gálico) y flavonoides (Quercetina, catequina) [43]. Así mismo, el radical ABTS•+ es reactivo frente a antioxidantes que incluyen aminoácidos, péptidos, tioles, indoles, entre otros [43].

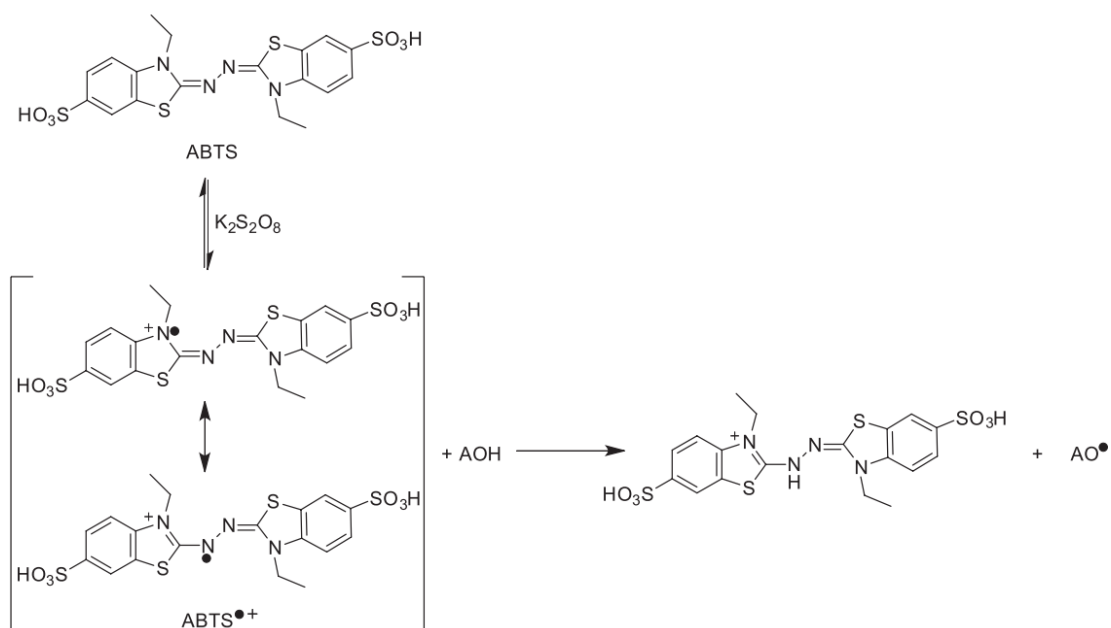


Figura 5-12. Oxidación de ABTS con persulfato de potasio para generar el catión radical ABTS•+ y su reacción con un antioxidante [47].

Realizado por: Loja Bryan, 2022

El ensayo del poder férrico reductor/antioxidante (FRAP), es un método directo relativamente sencillo, rápido y barato, que mide con gran sensibilidad, reproducibilidad y robustez, la actividad antioxidante combinada de los antioxidantes reductores (donadores de electrones) en una muestra de ensayo [43] Figura 6. De manera específica, este ensayo mide el aumento de la forma reducida de una molécula oxidante señal (sal Fe^{3+} -TPTZ), la cual al ser reducida por la acción combinada de los reductores (antioxidantes) redox activos y donadores de electrones presentes en la muestra, ésta cambia de un color café casi incoloro a un color azul intenso (absorción a 593 nm) [43,45,46]. Entre los antioxidantes que reaccionan con la sal Fe^{3+} -TPTZ se incluyen el ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), el ácido úrico, la bilirrubina y los compuestos polifenólicos como las catequinas y otros flavonoides de los alimentos de origen vegetal [43]. Además, cada molécula de un antioxidante reactivo redox individual puede donar uno, dos o más electrones dependiendo de su naturaleza, y así puede reducir una, dos o más moléculas de Fe^{3+} -TPTZ a su forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) de color azul. Finalmente, en el ensayo FRAP, moléculas como la glucosa y fructosa no reaccionan y los grupos tiol (presentes en ciertas proteínas, aminoácidos y el glutatión) reaccionan de manera lenta; lo cual a su vez permite discriminar muestras con alto contenido antioxidante proteico [43].

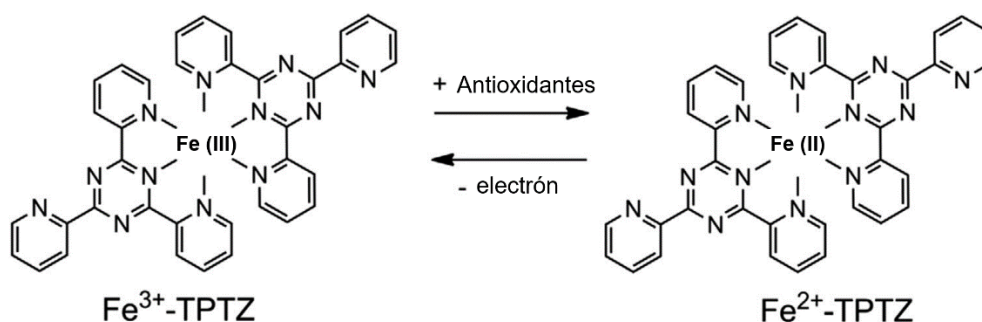


Figura 6-12. Formación del complejo Fe^{2+} -TPTZ a partir del complejo Fe^{3+} -TPTZ con un agente antioxidante [48].

Realizado por: Loja Bryan, 2022

1.2. Planteamiento del problema a investigar

Los antioxidantes son compuestos que pueden retrasar, prevenir o inhibir la oxidación (estrés oxidativo) causada por los radicales libres (ERO) [24,49], los cuales inician reacciones en cadena que dañan las células [25]. A su vez, los antioxidantes son capaces de formar un nuevo radical estable a través del enlace de hidrógeno intramolecular en una oxidación posterior [49]. El sistema antioxidante humano se divide en dos grupos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes no

enzimáticos se caracterizan por ser de carácter exógeno y los adquirimos a través de la dieta. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos podemos encontrar [24,25]: minerales, vitaminas, carotenoides, antioxidantes de bajo peso molecular (compuestos nitrogenados no proteicos), compuestos organosulfurados, cofactores y compuestos fenólicos (polifenoles).

La conciencia sobre la inclusión de frutas y verduras frescas en la dieta humana está aumentando [50,51], no solo por sus atractivas propiedades sensoriales, sino también por sus beneficios nutricionales y para la salud [51,52]. Esto se debe a que existe una asociación inversa entre el consumo de algunas frutas y la mortalidad por enfermedades relacionadas con la edad [21]. Los antioxidantes son abundantes en las frutas y verduras [19,25,27], especialmente en compuestos fenólicos, que son los antioxidantes hidrofílicos más abundantes en la dieta y los compuestos antioxidantes más activos [21,27]. Por lo tanto, la búsqueda de antioxidantes a partir de fuentes naturales ha recibido mucha atención para la obtención de nutraceuticos; los cuales ayudan a la mejora de la salud o la prevención de enfermedades, o ambas cosas [21,23,53].

Los frutos del género *Gustavia* [8] y *Theobroma* [15] presentan actividad antioxidante. Entonces, el objetivo de esta investigación es evaluar el potencial nutraceutico de estas plantas presentes en el sistema agroforestal chakra con perspectiva a la diversificación de la oferta de productos innovadores para el consumo humano. Para ello, se busca determinar el perfil fenólico (fitoquímicos de interés), cuantificar el contenido de teobromina, cafeína, fenoles y flavonoides totales, en conjunto con varios ensayos de actividad antioxidante por medio de la eliminación de radicales DPPH, ABTS y FRAP.

1.3. Justificación de la investigación

El sistema agroforestal de la chakra desempeña un rol fundamental en la producción de alimentos de una manera sostenible, además de contribuir a la adaptación al cambio climático y la conservación de la biodiversidad en las comunidades amazónicas de Ecuador [54]. Este sistema agroforestal tradicional engloba un conjunto de plantas que pueden ser árboles, arbustos, trepadoras, plantas medicinales, frutales, resinas, herbáceas, plantas ornamentales, aceites esenciales o especias, insecticidas o fibras para la artesanía y para la venta, consumo familiar y alimentación de los animales de finca [5,54,55]. Sin embargo, a pesar de la ventajosa biodiversidad con la que cuenta la región amazónica, existe escasa información acerca de los compuestos bioactivos

presentes en las plantas [56]. Y es que de manera general en Ecuador, la investigación científica sobre ciertas especies de plantas comestibles es escasa [57].

La domesticación desencadena una amplia gama de rasgos morfológicos y fisiológicos que distinguen a los cultivos domesticados de sus antepasados silvestres [58]. Estas características se denominan síndrome de domesticación, lo cual puede generar una reducción del contenido de metabolitos secundarios [58,59]. Estos metabolitos secundarios actúan como mecanismo de defensa de las plantas y a su vez pueden exhibir beneficios para la salud humana [27,33]. Metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos pueden verse afectados por la domesticación [60]. El pasu y el cacao blanco son frutales que se pueden encontrar tanto en estado silvestre como semidomesticados. Entonces, estos frutales al no presentar un alto grado de domesticación, pueden contener una mayor cantidad de compuestos bioactivos (polifenoles), de los cuales no existe una caracterización total.

En el caso del *Gustavia macarenensis* Philipson o pasu, se describe que tiene un buen sabor, sin embargo, se conoce muy poco de las propiedades del fruto, lo que genera una escasa demanda de su consumo [61]. Hasta el momento, la caracterización química y actividad antioxidante de los tres componentes del fruto de *G. macarenensis* como son la cáscara, pulpa y semilla en el país es escasa. Existiendo estudios apenas del mesocarpio (pulpa) y su aceite vegetal [8,10], que indican que los frutos de esta especie pueden considerarse una buena fuente de aceite vegetal y el aceite extraído del mesocarpio de *G. macarenensis* contiene ácidos grasos beneficiosos para la salud humana como el ácido palmítico, ácido oleico u Omega 9, ácido linoleico u Omega 6 y ácido esteárico; que son de gran interés en la industria farmacológica y cosmética. Además, se reportó que el aceite de *G. macarenensis* presentó un elevado contenido de fenoles totales ($156,49 \pm 2,62$ mg GAE/Kg de aceite) en comparación con algunas variedades de aceite de oliva y de mango brasileño, sin embargo; el aceite reportó una menor actividad antioxidante que otros frutos con los que fue comparado, mediante ensayo DPPH [10].

En lo que respecta a la especie *Theobroma bicolor* o cacao blanco, Ecuador posee poca información en cuanto a los ejemplares existentes de esta especie, en parte sucede con la disponibilidad y la productividad del fruto; siendo difícil el aprovechamiento y conservación de esta especie [57]. Existen algunos estudios que evalúan su actividad antioxidante [15,30,62] y determinan sus compuestos fenólicos [30,62]. Sin embargo,

estos estudios se enfocan en ejemplares del cacao blanco de origen mexicano [15] y peruano [30,62], más no de la ejemplares presente en Ecuador. Además, cabe recalcar que estos estudios, sólo evaluaron la pulpa y la semilla. De los cuales, el ejemplar peruano de *T. bicolor* reportó que la pulpa presenta una excelente actividad antioxidante (ensayo DPPH) y una importante concentración de compuestos fenólicos. Mientras que las semillas del ejemplar mexicano y peruano de *T. bicolor* reportaron una cantidad de fenoles totales y una actividad antioxidante (ensayos DPPH y ABTS) muy reducida en relación con las especies comparadas.

La bioprospección es la búsqueda sistemática de compuestos naturales y otros productos con potencial económico que pueden encontrarse en la diversidad mundial de plantas, animales y microorganismos [63]. En una fase primaria, el proceso bioprospectivo consta en la identificación y caracterización de los compuestos bioactivos de interés [64]. De esta manera, se busca aportar con el perfil fenólico correspondiente a los componentes de los frutos como son la cáscara, la pulpa y la semilla, ya que muchas veces el consumo de productos de las plantas deja de lado residuos orgánicos como la cáscara que pueden tener un uso potencial [57]. Esto nos ayudará a determinar la existencia de compuestos químicos beneficiosos para la salud y así compararlos con los encontrados en la literatura. Así mismo, se proponen varios ensayos para determinar la eliminación de radicales libres (actividad antioxidante): DPPH, ABTS y FRAP. Siendo estos ensayos, los más utilizados a lo largo de los años para el análisis en alimentos [45,65]. Todas estas actividades nos podrían ayudar a establecer si alguna de estas frutas es un potencial alimento nutraceutico o sirve como ingrediente en formulaciones de alimentos funcionales.

1.4. Objetivos de la Investigación

1.4.1. Objetivo General

Determinar el potencial nutraceutico de dos frutos amazónicos del sistema agroforestal chakra.

1.4.2. Objetivos Específicos

Identificar compuestos fenólicos presentes en el pasu (*Gustavia macarenensis* Philipson) y cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.).

Determinar la actividad antioxidante del pasu (*Gustavia macarenensis* Philipson) y cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.) mediante diversos ensayos de eliminación de radicales libres.

Evaluar el potencial nutracéutico del pasu (*Gustavia macarenensis* Philipson) y cacao blanco (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.).

CAPÍTULO II: MARCO METODOLÓGICO

2.1. Preparación de muestras de extracto en metanol

Los frutos se obtuvieron del mercado “Productos de la zona” ubicado en el cantón Tena. Cada fruto se dividió en sus partes: cáscara, pulpa y semilla. Una vez pesadas y separadas las muestras, se liofilizaron. Para la obtención de extractos metanólicos se plantearon dos métodos de extracción [66,67]: Agitación (2 horas; 350 rpm) y Sonicación (20 minutos, 50°C) con previa maceración. Para ambos métodos se pesaron las muestras liofilizadas y se añadió un volumen de metanol (80%) correspondiente a 5 o 10 veces el peso de la muestra liofilizada. Luego, se filtraron las muestras liofilizadas y se cubrió con papel aluminio. Posteriormente, los extractos metanólicos fueron concentrados en el rotavaporador y almacenados en viales hasta su uso en los ensayos.

2.2. Ensayo de inhibición del radical DPPH

La actividad antioxidante de los extractos y del compuesto estándar (TROLOX y ácido gálico) se midió en términos de capacidad de donación de hidrógeno o de barrido de radicales mediante el método del DPPH estable. El efecto antioxidante sobre el radical DPPH se estimó según el procedimiento descrito por Sánchez-Moreno et al.[68]. Se preparó la respectiva solución de DPPH (DPPH 0,022% en etanol absoluto), solución TROLOX 2000 µM y solución de ácido gálico 294 µM. Las muestras de cacao blanco y

pasu se prepararon a una concentración de 5 mg/mL. Para determinar el valor de ic_{50} de las muestras, se realizó un barrido (screening) de las mismas a 100 μ g/mL y seguido se crearon las respectivas curvas de dosis-respuesta. El ensayo se desarrolló en placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia de cada muestra (A), la absorbancia de la muestra sin solución DPPH (A') y la absorbancia de la solución DPPH (A°). Para medir (A), se mezcló 100 μ L de etanol absoluto con 100 μ L de solución de muestra y 50 μ L de solución de DPPH. Para medir el blanco (A'), se mezcló 150 μ L de etanol absoluto con 100 μ L de solución de muestra o solución estándar. Para medir (A°), se mezcló 200 μ L de etanol absoluto con 50 μ L de solución DPPH. Todos los análisis se hicieron por triplicado. A continuación, se cubrió la placa con papel aluminio y se dejó incubar durante 30 minutos en un agitador de placas para su posterior lectura a 490 nm. Los rangos de las curvas de calibración correspondiente a los estándares de trabajo fueron 10-300 μ M para TROLOX y 5-100 μ M para ácido gálico. El porcentaje de inhibición de la actividad de DPPH se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibicion} = \left[1 - \frac{(A - A')}{A^{\circ}} \right] \times 100$$

A: Absorbancia de la MUESTRA

A': Absorbancia de la muestra sin solución DPPH (BLANCO)

A°: Absorbancia solución DPPH

2.3. Ensayo de decoloración del catión radical ABTS

Según Re et al.[69], plantea que la capacidad de eliminación de radicales libres de los extractos también se puede determinar, mediante el ensayo de decoloración del catión radical ABTS. Este ensayo se basa en la reducción de los radicales ABTS•+ por los antioxidantes presentes en los extractos. Inicialmente, se preparó una solución de 7mM de ABTS y 2,45 mM de persulfato de amonio. Para esto, se pesó 7,20 mg de ABTS y 1,12 mg de persulfato de amonio, y se disolvieron en 2 mL de agua destilada. Luego, se agitó y se dejó reposar por 12 horas en oscuridad. Posteriormente, se ajustó con etanol absoluto la absorbancia de la solución ABTS (ABTS con persulfato de amonio) en 751,5 nm a 0,7. Además, se prepararon las soluciones de los estándares de TROLOX a 2000 μ M y quercetina a 1700 μ M. Las muestras se prepararon a una concentración de 5 mg/mL. Para determinar el valor de ic_{50} de las muestras, se realizó un barrido (screening) de las mismas a 100 μ g/mL y seguido se crearon las respectivas curvas de

dosis-respuesta. El experimento se desarrolló en tubos de ensayo de 5 mL y se midió la absorbancia de cada muestra (A), la absorbancia de la muestra sin solución ABTS (A') y la absorbancia de la solución ABTS (A°). Para medir (A), se mezcló 150 µL de cada muestra con 2850 µL de solución ABTS. Para medir el blanco (A'), se mezcló 150 µL de cada muestra con 2850 µL de mezcla agua-etanol absoluto [1:2]. Para medir (A°), se mezcló 150 µL de mezcla agua-etanol absoluto [1:2] con 2850 µL de la solución ABTS. Todos los ensayos se hicieron por triplicado. A continuación, se dejó incubar los tubos de ensayo durante 4 minutos en oscuridad para su posterior lectura a 751,5 nm. Los rangos de las curvas de calibración correspondiente a los estándares de trabajo fueron 10-300 µM para TROLOX y 1-25 µM para quercetina. El porcentaje de inhibición de la actividad de ABTS se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibicion} = \left[1 - \frac{(A - A')}{A^{\circ}} \right] \times 100$$

A: Absorbancia de la MUESTRA

A': Absorbancia de la muestra sin solución ABTS (BLANCO)

A°: Absorbancia solución ABTS

2.4. Ensayo de poder antioxidante por reducción férrica (FRAP)

El poder antioxidante por reducción férrica (FRAP) se determinó según el método de Benzie & Strain [70]. Para este ensayo se preparó una solución buffer de acetato de sodio (20 mM, pH 3,6), una solución 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) 10 mM y una solución FeCl₃·6H₂O (20 mM). La solución TPTZ se disolvió en con una solución de HCl 40 mM. Luego, se obtuvo la solución FRAP mezclando 10 mL buffer con 1 mL TPTZ y 1 mL FeCl₃·6H₂O. La solución FRAP se dejó incubar a 37°C previo al análisis. Las muestras se disolvieron en buffer acetato (pH 3,6). Así mismo, se prepararon las soluciones estándares de sulfato de hierro a 0,9 mM y ácido ascórbico a 0,6 mM. El ensayo se desarrolló en placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia de cada muestra y la absorbancia de la solución FRAP. Para medir la absorbancia de las muestras, se mezcló 10 µL de la solución de muestra con 30 µL de agua destilada y 300 µL de solución FRAP. Para medir la absorbancia de la solución FRAP, se mezcló 40 µL de agua destilada con 300 µL de solución FRAP. A continuación, se dejó incubar la placa por 4 minutos y se leyó la absorbancia a 600 nm. Todas las mediciones se hicieron por triplicado. Los rangos de las curvas de calibración correspondiente a los estándares de

trabajo fueron 0,1-1 mM para sulfato de hierro y 0,05-0,5 μ M para ácido ascórbico. Los resultados serán expresados en mmoles Fe^{2+} /g extracto.

2.5. **Contenido fenólico total**

La determinación del contenido fenólico total en los extractos se ajustó al método de Medina [71] con modificaciones. Primero, se preparó una solución de carbonato de sodio (7%) y una solución del estándar ácido gálico (0,5mg/mL). Para la preparación de las muestras, se pesó 5 mg de extracto y se disolvió en 1 mL de mezcla agua:metanol (50:50). Entonces, se mezcló 100 μ L de extracto en 40 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu; seguido de 860 μ L de agua destilada. A continuación, se realizó un vortex por pocos segundos y se dejó incubar en oscuridad durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se mezcló con 100 μ L de la solución carbonato de sodio (7%) y 900 μ L de agua destilada. Nuevamente, se realizó un vortex por pocos segundos y se dejó incubar en oscuridad durante 60 minutos. Este proceso se realizó por triplicado para cada muestra de extracto. Finalmente, la absorbancia se leyó a 750 nm. La curva de calibración se preparó utilizando varias concentraciones de ácido gálico (25-400 μ g/mL) disueltas en agua destilada. Los resultados se expresaron como μ g equivalente de ácido gálico (EAG)/ mg de extracto.

2.6. **Contenido de flavonoides totales**

La determinación del contenido de flavonoides totales en los extractos se basa en el método descrito por Wang et al.[72] con pequeñas modificaciones. Inicialmente, se preparan las soluciones de tricloruro de aluminio (AlCl_3) al 2% en metanol y la solución inicial del estándar quercetina (0,5 mg/mL). De la solución inicial de quercetina se tomó 1 mL y se ajustó a un volumen de 5 mL con metanol; obteniendo una solución final de 100 μ g/mL. Las muestras se prepararon a una concentración inicial de 5 mg/mL, de esta solución se tomó 1 mL y se aforó en 4 mL con metanol. Las muestras se evaluaron a una concentración de 1,25 mg/mL. Entonces, se mezclaron 1 mL de AlCl_3 con 1 mL de las soluciones de las muestras. Se dejó incubar por 15 minutos y la absorbancia se leyó a 438 nm contra una muestra en blanco que consistía en una solución de extracto (1 mL) con metanol (1 mL) sin AlCl_3 . La curva de calibración se preparó utilizando un rango de concentraciones de quercetina comprendido entre (0,5-5 μ g/mL) y disueltas en solución de metanol. Los resultados se expresaron como μ g equivalentes de quercetina (EQ)/ mg extracto.

2.7. Contenido de antocianinas

La determinación de antocianinas se realizó a partir de la extracción en una relación 1:50 (m:v), 1 g de muestra liofilizada se homogenizó con la solución extractora (1,5 N HCl en 85% de etanol) y se extrajo durante 24 h bajo refrigeración en la oscuridad. Los extractos fueron filtrados (Whatman No. 1 filter paper), la absorbancia de los extractos fue medida a 535 nm. El contenido de antocianinas se calculó usando la siguiente ecuación con el respectivo coeficiente de absorción 982 (g 100 ml⁻¹)⁻¹ cm⁻¹.

$$\text{Contenido de antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{g base seca}} \right) = \frac{(\text{ABS} \times \text{factor de dilución}) \times 1000}{(\text{peso seco de la muestra} \times \epsilon_{1\text{cm}, 535}^{1\%})}$$

Donde ABS es la absorbancia de la lectura de la muestra a 535 nm, $\epsilon_{1\text{cm}, 535}^{1\%}$ es el coeficiente de absorción para antocianinas.

Esta metodología fue implementada en colaboración con la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE). Los extractos de cacao blanco fueron obtenidos en la Universidad Regional Amazónica Ikiam (Tena) y enviados a la PUCE para el análisis respectivo. A diferencia de los extractos de pasu, los cuales fueron obtenidos en las instalaciones de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en Quito. Los extractos del pasu se obtuvieron de acuerdo a la metodología descrita en esta sección.

2.8. Determinación de perfil fenólico del extracto metanólico de cacao blanco y pasu

Los compuestos fenólicos fueron separados e identificados según lo descrito por Bessada et al.[73] con ligeras modificaciones. Los extractos metanólicos obtenidos de las cáscaras, pulpas y semillas se disolvieron en agua destilada a 5mg/mL. Los análisis cromatográficos se realizaron por cromatógrafo líquido (UPLC) Marca Waters Modelo I-Class acoplado a un espectrómetro de masas con ionización por electrospray ESI-MS en un modo de ion negativo Marca Waters Modelo Xevo G2 QTOF. Se utilizó el software Mass Lynx NT 4.1 (Waters, Milford, EE. UU.) y UNIFI TM v1.8 (Waters) para la adquisición y el procesamiento de datos.

La separación de compuestos fenólicos se realizó en una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (Waters, Millford, EE. UU.) (1,7 µm, 2,1 × 50 mm d.i.). Los disolventes utilizados como fase móvil fueron ácido fórmico al 0,01% en agua como disolvente A y

100% de acetonitrilo como disolvente B. El gradiente de elución establecido fue del 1% de B (1 min), del 1 al 20% de B (10 min), del 20 al 25% de B (10 min), del 25 al 35% de B (5 min), del 35 al 50% de B (5 min), y reequilibrio de la columna, operando a un caudal de 0,25 mL/min.

El análisis por espectrometría de masas se realizó con una fuente de ionización por electropulverización (ESI) en un rango de masa de m/z 100 a 1200 Da en modo negativo con un voltaje capilar de 0,5 kV, flujo de gas de cono de 20 L / h, flujo de gas de desolvatación de 900 L / h, fuente temperatura de 140 °C, temperatura de desolvatación de 450 °C con cono de muestreo y compensación de fuente a 40 y 80, respectivamente.

2.9. Cuantificación de teobromina, cafeína, catequina y epicatequina en cacao blanco por RP-HPLC

La cuantificación de ciertos flavonoides (catequina y epicatequina) y metilxantinas (teobromina y cafeína) de interés, se realizó de acuerdo a lo propuesto por Risner [74] con pequeñas modificaciones. Entonces, los estándares teobromina, cafeína, catequina y epicatequina se prepararon a partir de una solución inicial (200 mg/L), donde se pesó 10 mg del estándar correspondiente y se aforó en 50 mL de agua destilada tipo 1. De estas soluciones iniciales, se tomó 8 mL de solución de teobromina, 2mL de cafeína, 2mL catequina, 2 mL de epicatequina y se aforaron en 20 mL con agua destilada tipo 1 respectivamente. Así, se obtuvo una concentración final de 80 mg/L de solución de teobromina y 20 mg/L para las soluciones de los estándares restantes. Los rangos de las curvas de calibración correspondiente a los estándares de trabajo fueron 5-80 mg/mL para la teobromina y 1,25-20 mg/mL para la cafeína, catequina y epicatequina. Las curvas fueron realizadas por duplicado.

Para la preparación de las muestras de cacao blanco, se disolvieron 20 mg de los extractos previamente tratados (desengrasados y liofilizados) en 5 mL de agua destilada. Las muestras fueron homogenizadas mediante ultrasonido por 10 min y vortex por 1 minuto. A continuación, se colocaron en baño maría a 60°C por 12 min, luego se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, los extractos se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0,45 μ m y se colocaron 200 μ L de muestra en cada vial.

Los análisis por HPLC se realizaron con un sistema de cromatografía líquida Marca Waters, equipado con un sistema de bomba binaria (modelo 1525), auto-muestreador (modelo 2707) y detector UV-Vis (modelo 2489). El sistema operó a un flujo de 0,5 mL/min y a una longitud de onda de 273 nm. Se utilizó una columna Gemini® C18 (150 x 2mm, con un tamaño de partícula de 5 µm). La fase móvil utilizada fue agua como disolvente A y metanol como disolvente B. El gradiente de elución se estableció isocráticamente a 15% de B por 10 min, del 15 al 25% de B (10 min), del 25 al 30% de B (15 min), del 30 al 100% de B (5 min) y finalmente del 100 al 15% de B (13 min). El volumen de inyección fue de 20 µL. El tiempo de corrida fue de 43 min. Todos los análisis se hicieron por triplicado.

2.10. Análisis Estadístico

Los experimentos se realizaron por triplicado expresando los resultados como media $\pm$ desviación estándar (DE). Los datos se procesaron utilizando Microsoft Excel 2013 y los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y la significación de las diferencias entre las medias de las muestras se calculó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

CAPÍTULO III: PRESENTACIÓN DE DATOS Y RESULTADOS

3.1. Extractos metanólicos

La Tabla 1 muestra los resultados de la extracción, a partir de los métodos de extracción agitación y sonicación. Esto con el propósito de comparar cuál de los dos métodos exhibía una mayor cantidad de masa final a partir de las masas iniciales de las muestras liofilizadas (Anexo 2.2). Se determinó que la pulpa del cacao blanco y la cáscara del pasu, presentaron los mayores rendimientos (%) de extracción por ambos métodos. Mientras, las semillas de ambos frutos presentaron los rendimientos (%) más bajos, ya sea por agitación o sonicación.

Tabla 1-11: Rendimiento de extracción de la cáscara, pulpa y semilla del cacao blanco y pasu

Método de Extracción	Fruta	Cáscara [%]	Pulpa [%]	Semilla [%]
Agitación	Cacao Blanco	9,26	42,69	4,71
	Pasu	24	20,11	5,21
Sonicación	Cacao Blanco	9,92	39,5	5,41
	Pasu	20,82	17,32	5,07

Realizado por: Loja, Bryan, 2022.

3.2. Contenido fenólico total

En la Tabla 2 se muestra que, para el cacao blanco, el contenido fenólico total varió entre 4,63 y 84,41 µg de EAG por mg de extracto (parte de la fruta). Mientras, que para el pasu los valores variaron entre 6,31 y 98,51 µg de EAG por mg de extracto. Siendo las cáscaras de ambas frutas, las que exhibieron el mayor contenido fenólico. Por otra parte, la pulpa del cacao blanco y la semilla del pasu, presentaron el menor contenido fenólico (4,63 y 6,31 µg EAG/mg de ext, respectivamente). Además, de acuerdo con el análisis de varianza se obtuvo diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido fenólico total de la pulpa de cacao blanco al aplicar ambos métodos de extracción. Sin embargo, no se observó diferencias significativas ($P > 0,05$) en el contenido fenólico total de la cáscara y la semilla al aplicar ambos métodos de extracción. Así mismo, el contenido fenólico total en la cáscara y la pulpa del pasu presentaron variación significativa ($P < 0,05$) al aplicar ambos métodos de extracción. Finalmente, la semilla del pasu no exhibió diferencias significativas ($P > 0,05$) en el contenido fenólico total por ambos métodos de extracción. Además, se realizó la validación del método analítico mediante espectrometría UV-Vis y se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación (16,9606 y 17,0375 ppm, respectivamente).

Tabla 2-11: Contenido fenólico total en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco y pasu

Fruta	Parte de la fruta	Fenoles totales (μg EAG/mg de extracto)		% Fenoles Totales	
		Agitación	Sonicación	Agitación	Sonicación
Cacao Blanco	Cáscara	84,11 $\pm$ 0,31	84,41 $\pm$ 0,04	8,411 $\pm$ 0,031	8,441 $\pm$ 0,004
	Pulpa	4,63 $\pm$ 0,07	4,94 $\pm$ 0,08	0,463 $\pm$ 0,007	0,494 $\pm$ 0,008
	Semilla	13,63 $\pm$ 0,25	13,29 $\pm$ 0,11	1,363 $\pm$ 0,025	1,329 $\pm$ 0,011
Pasu	Cáscara	92,33 $\pm$ 0,24	98,51 $\pm$ 0,33	9,233 $\pm$ 0,024	9,851 $\pm$ 0,033
	Pulpa	37,73 $\pm$ 0,44	41,97 $\pm$ 0,03	3,773 $\pm$ 0,044	4,197 $\pm$ 0,003
	Semilla	6,31 $\pm$ 0,12	6,44 $\pm$ 0,10	0,631 $\pm$ 0,012	0,644 $\pm$ 0,010

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media $\pm$ Desviación Estándar (n = 3).

3.3. Contenido de flavonoides totales

En la Tabla 3, se muestra que, para el cacao blanco, el contenido total de flavonoides varió entre 0,60 y 1,06 μg de EQ por mg de extracto (parte de la fruta). Mientras, el pasu presenta valores entre 0,58 y 1,77 μg de EQ por mg de extracto. Las cáscaras de ambas frutas exhibieron el mayor contenido total de flavonoides. Por otra parte, la pulpa del cacao blanco y la semilla del pasu, presentaron el menor contenido de flavonoides. Así mismo, se observó que no hay variación significativa ($P > 0,05$) en el contenido total de flavonoides (μg EQ/mg de ext) del cacao blanco y del pasu al aplicar ambos métodos de extracción. Por el contrario, se obtuvo diferencias significativas ($P < 0,05$) en el contenido total de flavonoides entre ciertas partes de cada fruta. Entre la cáscara y la pulpa del cacao blanco existe variación significativa en el contenido total de flavonoides, más no entre la semilla con la cáscara y la pulpa. Como caso particular, el contenido de flavonoides totales en la pulpa del cacao blanco no se pudo determinar, ya que sus valores se encontraban por debajo del límite de detección de la curva de calibración establecida. En el pasu, el contenido total de flavonoides de la cáscara con respecto a la pulpa y la semilla varia de forma significativa ($P < 0,05$), sin embargo, no se observó

variación significativa en el contenido total de flavonoides entre las partes de la pulpa y la semilla del fruto.

Así mismo, se realizó la validación del método analítico mediante espectrometría UV-Vis y se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación (0,30936 y 0,34540 ppm, respectivamente).

Tabla 3-11: Contenido de flavonoides totales en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco y pasu

Fruta	Parte de la fruta	Flavonoides totales (ug EQ/mg de extracto)		% Flavonoides Totales	
		Agitación	Sonicación	Agitación	Sonicación
Cacao Blanco	Cáscara	1,06±0,06	0,91±0,21	0,106±0,006	0,091±0,021
	Pulpa	0,60±0,04	ND	0,060±0,004	ND
	Semilla	0,84±0,25	0,62±0,15	0,084±0,025	0,062±0,015
Pasu	Cáscara	1,73±0,20	1,77±0,18	0,173±0,020	0,177±0,018
	Pulpa	0,84±0,07	0,79±0,20	0,084±0,007	0,079±0,020
	Semilla	0,69±0,05	0,58±0,18	0,069±0,005	0,058±0,018

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media ± Desviación Estándar (n = 3). ND: No se detectó.

En la determinación del contenido de catequina y epicatequina presente en el cacao blanco, se observaron algunas particularidades. En la Tabla 3, se muestra que la catequina en la cáscara de cacao blanco fue detectada, más no fue cuantificada; de acuerdo a los límites de detección y cuantificación determinados. Esto ocurrió al aplicar tanto el método de agitación como el de sonicación para la obtención del extracto. Por el contrario, los valores de epicatequina en la cáscara de cacao blanco fueron de 19,59 mg Epicatequina/ g extr por el método de agitación y 22,77 mg Epicatequina/ g extr por el método de sonicación. Con respecto a la pulpa del cacao blanco, el contenido de catequina y epicatequina se describe como no detectados (ND); ya que los valores se encontraban por debajo del límite de detección de la curva de calibración establecida. También, esto sucedió de manera independiente al método de extracción aplicado. Finalmente, en la semilla de cacao blanco solo fue posible determinar el contenido de catequina aplicando el método de sonicación (0,35 mg Catequina/ g extr). En relación

al, contenido de epicatequina en la semilla no se pudo detectar por ningún método de extracción.

Los valores del límite de detección y cuantificación de la catequina fueron 0,25 y 0,3 mg/L, respectivamente. Mientras, que los valores del límite de detección y cuantificación de la epicatequina fueron 0,25 y 0,4 mg/L, respectivamente.

Tabla 4-11: Contenido de catequina y epicatequina en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco

Fruta	Parte de la fruta	mg Catequina/ g extracto		mg Epicatequina/ g extracto	
		Agitación	Sonicación	Agitación	Sonicación
Cacao Blanco	Cáscara	<LC	<LC	19,59±1,45	22,77±1,34
	Pulpa	ND	ND	ND	ND
	Semilla	<LC	0,35±0,35	ND	ND

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media ± Desviación Estándar (n = 3).

<LC, compuesto presente en la muestra por debajo del límite de cuantificación (LC).

ND: No se detectó.

3.4. Contenido de Antocianinas

En la Tabla 5, se muestra el contenido de antocianinas totales presentes en el cacao blanco. Los valores variaron entre 4,08 y 15,37 mg de antocianinas por 100 g de extracto. Por el método de agitación, la cáscara exhibió el mayor contenido de antocianinas (14,24 mg de antocianinas/100 g ext), mientras que la pulpa presentó el menor contenido de antocianinas (4,08 mg de antocianinas/100 g ext). Por el método de sonicación, la semilla del cacao blanco mostró el mayor contenido de antocianinas (15,37 mg de antocianinas/100 g ext), mientras que la cáscara presentó el menor contenido de antocianinas (4,60 mg de antocianinas/100 g ext). De acuerdo al análisis de varianza, se observó variación significativa ($P < 0,05$) en el contenido de antocianinas tanto entre las partes del fruto, como entre los métodos de extracción.

Tabla 5-11: Contenido de antocianinas en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco

Fruta	Parte de la fruta	Antocianinas (mg/100 g ext)	
		Agitación	Sonicación
Cacao Blanco	Cáscara	14,24±0,02	4,60±0,06
	Pulpa	4,08±0,13	5,41±0,08
	Semilla	5,98±0,00	15,37±0,00

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media ± Desviación Estándar (n = 3).

En el pasu, el contenido de antocianinas varió entre 5,79 y 25,57 mg de antocianinas por 100 g de extracto, como se muestra en la Tabla 6. Además, se evidenció diferencia significativa ($P < 0,05$) en el contenido de antocianinas entre las distintas partes del fruto.

Tabla 6-11: Contenido de antocianinas en cáscara, pulpa y semilla de pasu

Fruta	Parte de la fruta	Antocianinas (mg/100 g ext)
Pasu	Cáscara	9,13±0,11
	Pulpa	25,57±0,60
	Semilla	5,79±0,13

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media ± Desviación Estándar (n = 3).

3.5. Ensayos de actividad antioxidante

En la Tabla 7, se muestra que los porcentajes de inhibición del radical DPPH por parte de los extractos de cacao blanco y pasu variaron de acuerdo al método de extracción aplicado. En la extracción por agitación, los extractos del cacao blanco exhibieron porcentajes de inhibición de DPPH entre 38,84-70,09%. Siendo el extracto de la cáscara el que mostró el mayor porcentaje de inhibición de DPPH, mientras que el extracto de la semilla mostró el menor porcentaje de inhibición. En cambio, los extractos del pasu mostraron porcentajes de inhibición de DPPH entre 37,93-75,30%. En la extracción por sonicación, los extractos del cacao blanco exhibieron porcentajes de inhibición de DPPH entre 41,80-70,90%. Mientras que, los extractos del pasu mostraron porcentajes de

inhibición de DPPH entre 35,41-70,76% por ambos métodos. En general, las cáscaras de ambas frutas presentaron los mayores porcentajes de inhibición de DPPH por ambos métodos de extracción. Por el contrario, los extractos de semilla de ambas frutas mostraron los porcentajes de inhibición de DPPH más bajos por el método de agitación. Los extractos de la pulpa de cacao blanco y semilla de pasu presentaron los menores porcentajes de inhibición de DPPH por el método de sonicación. De acuerdo al análisis de varianza, de todos los extractos, sólo el extracto de semilla del cacao blanco mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) en el % de inhibición entre los métodos de extracción aplicados. Además, entre las distintas partes del cacao blanco, sólo no se observó diferencias significativas ($P > 0,05$) en el % de inhibición de DPPH entre la pulpa y la semilla. Finalmente, entre las distintas partes del pasu se observó diferencias significativas ($P < 0,05$) en el % de inhibición de DPPH.

Así mismo, en la Tabla 7 se muestran los porcentajes de inhibición de ABTS por parte de los extractos de cacao blanco y pasu y su variación de acuerdo al método de extracción aplicado. Al obtener los extractos del cacao blanco por agitación, los porcentajes de inhibición de ABTS variaron entre 26,56-74,05%. Con el mismo método de extracción, los extractos del pasu presentaron porcentajes de inhibición de ABTS entre 13,89-99,44%. Al obtener los extractos del cacao blanco por sonicación, los porcentajes de inhibición de ABTS variaron entre 22,30-66,93%. Además, los extractos del pasu presentaron porcentajes de inhibición de ABTS entre 13,80-90,21%. Al igual que en el ensayo de DPPH, los extractos de las cáscaras del cacao blanco y del pasu presentaron los mayores porcentajes de inhibición de ABTS por ambos métodos de extracción. Mientras que, los extractos de la pulpa de cacao blanco y semilla del pasu mostraron los porcentajes de inhibición de DPPH más bajos para ambos métodos de extracción aplicados. De acuerdo al análisis de varianza, de todos los extractos, sólo los extractos de semilla del cacao blanco y del pasu no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) en el % de inhibición entre los métodos de extracción aplicados. Finalmente, el cacao blanco y el pasu presentaron variación significativa ($P < 0,05$) en el % Inhibición ABTS entre sus partes (cáscara, pulpa y semilla).

Tabla 7-11: Actividad antioxidante (DPPH, ABTS) en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco y pasu

Fruta	Parte de la fruta	Inhibición DPPH (%)		Inhibición ABTS (%)	
		Agitación	Sonicación	Agitación	Sonicación
Cacao Blanco	Cáscara	70,09±1,78	70,90±2,43	74,05±0,63	66,93±0,66
	Pulpa	42,31±2,26	41,80±1,07	26,56±1,40	22,30±0,74
	Semilla	38,84±1,69	48,45±0,30	43,87±0,57	43,42±1,11
Pasu	Cáscara	75,30±3,11	70,76±2,74	99,44±0,35	90,21±0,80
	Pulpa	47,74±1,53	44,37±1,66	34,02±0,29	27,24±0,01
	Semilla	37,93±2,69	35,41±0,71	13,89±0,02	13,80±0,07

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media ± Desviación Estándar (n = 3).

En la Tabla 8 se muestra los valores de mmoles Fe²⁺/g extracto de las frutas estudiadas, correspondientes al ensayo del poder antioxidante por reducción férrica (FRAP). Los extractos de la cáscara de cacao blanco y pulpa del pasu mostraron las actividades reductoras de iones férricos más fuertes por el método de agitación (2,23 y 7,55 mmoles Fe²⁺/g extracto, respectivamente) y sonicación (2,58 y 8,12 mmoles Fe²⁺/g extracto, respectivamente). En cambio, el extracto de pulpa de cacao blanco presentó la actividad reductora de iones férricos más baja (0,72 mmoles Fe²⁺/g extracto) por agitación y sonicación (0,61 mmoles Fe²⁺/g extracto). Así mismo, la semilla del pasu mostró una baja actividad reductora de iones férricos por agitación (0,97 mmoles Fe²⁺/g extracto) y sonicación (0,77 mmoles Fe²⁺/g extracto). De acuerdo al análisis de varianza, el extracto de pulpa de cacao blanco mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) en la actividad reductora de iones férricos entre los métodos de extracción aplicados. Así mismo, los extractos de la cáscara y semilla del pasu mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en su actividad reductora de iones férricos entre los métodos de extracción aplicados. Finalmente, el cacao blanco y el pasu presentaron variación significativa ($P < 0,05$) en la actividad reductora de iones férricos entre sus partes (cáscara, pulpa y semilla).

Tabla 8-11: Poder antioxidante por reducción férrica (FRAP) de cáscara, pulpa y semilla del cacao blanco y pasu

		FRAP (mmoles Fe ²⁺ /g extracto)	
Fruta	Parte de la fruta	Agitación	Sonicación
Cacao Blanco	Cáscara	2,23±0,31	2,58±0,17
	Pulpa	0,72±0,02	0,61±0,03
	Semilla	1,20±0,04	1,29±0,16
Pasu	Cáscara	3,76±0,25	5,46±0,29
	Pulpa	7,55±0,37	8,12±0,13
	Semilla	0,97±0,01	0,77±0,02

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media ± Desviación Estándar (n = 3).

En la Tabla 9, se muestra la concentración a la que los extractos de las diferentes partes del cacao blanco y pasu, ejercen la mitad de su efecto inhibitorio máximo (IC₅₀) sobre los radicales DPPH Y ABTS. Para la inhibición del radical DPPH, las cáscaras de cacao blanco y pasu, presentaron las concentraciones más bajas requeridas de sus extractos obtenidos por agitación (44,16 y 20,51 µg/mL, respectivamente) y sonicación (46,39 y 29,35 µg/mL, respectivamente). Por el contrario, la pulpa del pasu exhibió las concentraciones más altas requeridas de los extractos obtenidos por agitación (185,4 µg/mL) y sonicación (233 µg/mL). Además, las concentraciones de los extractos restantes de cacao blanco y pasu, se describieron como DNL. Para la inhibición del radical ABTS, las cáscaras de cacao blanco y pasu, también presentaron las concentraciones más bajas requeridas de sus extractos obtenidos por agitación (67,01 y 27,8 µg/mL, respectivamente) y sonicación (66,65 y 35,75 µg/mL, respectivamente). Mientras que, la pulpa de cacao blanco y la semilla del pasu, mostraron las concentraciones más altas requeridas de sus extractos obtenidos por agitación (2123 y 2392 µg/mL, respectivamente) y sonicación (2099 y 2508 µg/mL, respectivamente).

Tabla 9-11: Determinación de la IC₅₀ de los extractos de cacao blanco (CB) y pasu (PS).

DPPH IC ₅₀ [µg/mL]	ABTS IC ₅₀ [µg/mL]
-------------------------------	-------------------------------

Fruta	Parte de la fruta	Agitación	Sonicación	Agitación	Sonicación
CB	Cáscara	44,16±4,16	46,39±5,29	67,01±4,27	66,65±3,97
	Pulpa	NDO	NDO	2123,00±5,04	2099,00±4,92
	Semilla	NDO	NDO	612,70±2,84	615,00±5,39
PS	Cáscara	20,51±2,70	29,35±2,91	27,88±7,32	35,75±9,33
	Pulpa	185,40±2,6	233,00±2,28	146,00±5,92	225,40±6,14
	Semilla	NDO	NDO	2392,00±4,00	2508,00±1,78

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media $\pm$ Desviación Estándar (n = 3). NDO: No se determinó.

3.6. Cuantificación de teobromina y cafeína en cacao blanco

En la Tabla 10, se muestra el contenido de cafeína y teobromina determinados por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC). La pulpa del cacao blanco no presentó valores (niveles) de cafeína y teobromina por ningún método de extracción. En la cáscara del cacao blanco, el valor de cafeína fue de 0,50 mg Cafeína/ g extr por el método de agitación y por el método de sonicación fue de 0,32 mg Cafeína/ g extr. Para el contenido de teobromina en la cáscara de cacao blanco, los valores por los métodos de agitación y sonicación fueron 17,00 y 39,66 mg Teobromina/ g extr, respectivamente. En la semilla de cacao blanco, se determinó un valor de cafeína de 2,82 mg Cafeína/ g extr por el método de agitación y un valor de 3,29 mg Cafeína/ g extr por el método de sonicación. Además, en la Tabla 10, se muestra que la semilla de cacao blanco, contiene alrededor de 32,27 mg de Teobromina por gramo de extracto cuando se aplicó agitación. Al aplicar sonicación, el valor de teobromina fue de 34,11 mg Teobromina/ g extr.

Los valores del límite de detección y cuantificación de la cafeína fueron 0,25 y 0,3 mg/L, respectivamente. Mientras, que los valores del límite de detección y cuantificación de la teobromina fueron 1 y 1,6 mg/L, respectivamente.

Tabla 10-11: Contenido de cafeína y teobromina en cáscara, pulpa y semilla de cacao blanco

Fruta	Parte de la fruta	mg Cafeína/ g extr		mg Teobromina/ g extr	
		Agitación	Sonicación	Agitación	Sonicación

Cacao Blanco	Cáscara	0,50±0,09	0,32±0,00	17,00±0,74	39,66±0,73
	Pulpa	ND	ND	ND	ND
	Semilla	2,82±0,26	3,29±0,24	32,27±0,73	34,11±0,47

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

Los datos se presentan como media ± Desviación Estándar (n = 3). ND: No se detectó.

3.7. Identificación de compuestos en los extractos metanólicos del cacao blanco y pasu

Para seleccionar y comparar los compuestos químicos presentes en los distintos extractos de cacao blanco y pasu se utilizó el software UNIFI TM v1.8 (Waters), así como de la librería comercial "Traditional Medicine" (Waters). Los parámetros de procesamiento de datos se establecieron de la siguiente manera: la selección de aductos de +H, +K, +Na, +HCOO y -H, tiempo de retención 0,5-35,0 min; las intensidades de respuesta de los picos mayor a 100000 cuentan con una tolerancia de precisión de masa establecida en ±5 ppm.

En la Tabla 11, se muestra diferentes grupos de metabolitos tales como: alcaloides (β-carbolínicos, índoles y fenólicos), lignanos, terpenos, flavonoides (flavona), ácidos hidroxycinámicos, vitaminas, Saponinas y Quinazolininas.

Tabla 11-11: Metabolitos tentativamente identificados en los extractos de cacao blanco y pasu por UPLC-ESI-QTOF-MS.

Fruta	Compuesto identificado	Fórmula Química	m/z observado	Rt observado (min)	Aductor	Actividad Farmacológica	Referencias
Cacao Blanco	Flazina	C ₁₇ H ₁₂ N ₂ O ₄	353,0778	0,63	+HCOO	Inhibidor de la α-glucosidasa, Antioxidante	[75],[76]
	Oleraceina B	C ₂₅ H ₂₇ NO ₁₂	578,1487	6,73	+HCOO	Antioxidante	[77]
	(+)-Pinoresinol-β-D-glucopiranosido	C ₃₆ H ₄₂ O ₁₆	729,2428	0,67	-H	Actividad enzimática anti-lipasa Antioxidante	[78][79][80]
	Ácido Oleanólico-3-O-β-D-(6'-O-metil)-glucurónido	C ₃₇ H ₅₇ O ₉	645,3986	32,66	-H	Antidiabético y Antioxidante	[81]
	Ácido fólico	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	440,1324	31,62	-H	Antioxidante Función cognitiva Prevención de malformaciones congénitas	[82], [83],[84]
	Isocorinoxeina	C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₄	427,1894	7,43	+HCOO	Neuroprotector Anti-Alzheimer	[85],[86]
	Acetonil evodiamina	C ₂₂ H ₂₁ N ₃ O ₂	404,1624	9,04	+HCOO	Antiobesidad, Antialérgico, Analgésico, Antitumoral y Neuroprotector	[87]
Pasu	Isorhamnetina-3-gentiobiosa-7-glucosido	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₂	801,2080	3,93	-H	Protección cardiovascular y	[88]

						cerebrovascular, Antitumoral, Antiinflamatorio, Antioxidante, Antiobesidad	
	Bakuchiol	C ₁₈ H ₂₄ O	301,1811	8,96	+HCOO	Antioxidante, Antiinflamatorio, Antibacterial, Antienvejecimiento cutáneo	[89],[90]
	Hordatina A	C ₂₈ H ₃₈ N ₈ O ₄	595,2991	33,23	+HCOO	Inhibidor de las enzimas α- glucosidasa y DPP4	[91]
	Qingdainona	C ₂₃ H ₁₃ N ₃ O ₂	362,0939	4,27	-H	Anti-COVID-19	[92],[93]
	Lablabosida A	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₃	1147,5519	24,15	+HCOO	Adyuvante	[94]

Realizado por: Loja, Bryan, 2022

CAPÍTULO IV: INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

La extracción de compuestos fenólicos a partir de fuentes alimenticias, en este caso frutas, comprende algunos pasos básicos [67]: muestreo (cosecha o colecta, almacenamiento), preparación de la muestra (extracción, concentración, eliminación de interferencias), análisis instrumental (detección, identificación, cuantificación) y el procesamiento de los resultados (informe). Siendo la extracción uno de los pasos más importantes para su recuperación. Hoy en día existe una variedad de métodos de extracción, los cuales dependiendo de los parámetros establecidos (tipo de solvente, tiempo, temperatura y pH), reflejan un buen rendimiento y calidad de los extractos [27,66,67]. Para este trabajo se aplicó extracción sólido-líquido (método de agitación) y extracción por ultrasonido (método de sonicación). Las extracciones se realizaron en distintas condiciones, Agitación (2 horas, 350 rpm, 22°C) y Sonicación (20 minutos, 50°C); y no se observó mayor diferencia en los rendimientos de extracción en la Tabla 1. Así mismo, debido a las propiedades polares de los compuestos fenólicos, para su extracción se suelen utilizar disolventes próticos polares como las soluciones hidroalcohólicas. [27,67] Es por esto, que se trabajó con una solución de metanol al 80%. Sin embargo, el alcohol más usado es el etanol debido a su condición de "GRAS" (Generally Recognized-As-Safe según la American Food and Drug Administration), así como a su precio relativamente bajo [27].

El contenido fenólico en las frutas puede variar de acuerdo a algunos factores como la etapa de maduración en la que se colectó el fruto [95–97], los parámetros de extracción (temperatura y tiempo) [66,98] y de la solubilidad (polaridad) de estos compuestos [67]. En el presente trabajo, el contenido fenólico presente en el cacao blanco fue muy variado entre sus partes (cáscara>semilla>pulpa), al igual que en el pasu (cáscara>pulpa>semilla). Así mismo, se observó diferencias significativas en el contenido fenólico de ciertos extractos al aplicar un método de extracción u otro. Esto pudo deberse a los mismos parámetros de extracción. En el método de agitación (2 horas, 350 rpm, 22°C), al aumentar la temperatura de extracción, existe una mayor solubilidad de los analitos, incrementando la eficacia del proceso. Se considera que la temperatura para la extracción de los compuestos fenólicos no debe ser superior a 60°C [67]. Además, el aumento la temperatura conlleva una reducción del tiempo de extracción. En el método de sonicación, se trabajó a una frecuencia constante de 40 kHz (frecuencia máxima del equipo). Las ondas al chocar con la muestra inducen cambios fisicoquímicos, facilitando enormemente la extracción de los compuestos de

interés a diferencia de otros métodos [66,67]. Así mismo, la eficacia de la recuperación de los compuestos fenólicos se ve influenciada por factores como la temperatura, el tiempo de extracción y la frecuencia a la que se trabaja. Se debe tener en cuenta que las ondas de choque pueden provocar localmente temperaturas muy altas (hasta 5500K) y presiones (hasta 100MPa) [67], lo cual puede llegar a degradar compuestos fenólicos.

Como se mencionó en la parte superior, los compuestos fenólicos se clasifican en dos grupos principales: los flavonoides y los no flavonoides. En los compuestos del tipo no flavonoides podemos encontrar los ácidos fenólicos y en este grupo de compuestos se encuentra el ácido gálico [99], mismo compuesto que fue el estándar de referencia utilizado para determinar el contenido fenólico total de las frutas analizadas (Equivalentes de ácido gálico). Así mismo, a manera de especificar los resultados del contenido de flavonoides totales, se utilizó la quercetina (flavonol) [33], como estándar de referencia. Entonces, los resultados aquí reportados son en función de equivalentes de ácido gálico para el contenido fenólico total y de quercetina para el contenido de flavonoides totales presentes en las muestras analizadas. Esto con la finalidad de tener un contraste entre los dos grandes grupos de los compuestos fenólicos.

En comparación con otros estudios realizados en el pasu, se reporta un mayor contenido fenólico total en la pulpa del pasu $4,63 \pm 0,07 \mu\text{g EAG/mg}$ de extracto (4630 mg EAG/kg de ext), versus $156,49 \pm 2,62 \text{ mg EGA/Kg}$ de aceite [10]. La diferencia en el contenido principalmente recae en el uso del hexano, que es un agente extractor apolar. Así mismo, en la semilla cacao blanco se reporta un alto contenido fenólico total de $6,31 \pm 0,12 \mu\text{g EAG/mg}$ de extracto, versus los $3,37 \text{ mg EAG/g}$ de peso seco ($3,37 \mu\text{g EAG/mg}$ de peso seco) [15] y los $1,62 \pm 0,12 \text{ mg EAG/g}$ de extracto [100]. Sin embargo, el contenido fenólico de la semilla reportado en este trabajo es menor al contenido fenólico reportado por Tauchen et al.[30] ($102,8 \pm 4,3 \mu\text{g EAG/mg}$ de extracto).

El contenido de flavonoides totales presentes en el cacao blanco (cáscara>semilla>pulpa) y el pasu (cáscara>semilla>pulpa) fue variado entre las partes como se observa en la Tabla 2. Así mismo, como en el contenido fenólico total, se observó variación en el contenido de flavonoides totales entre los métodos de extracción aplicados. Esto pudo deberse a los mismos parámetros de extracción utilizados, tal como se describió en la parte superior. Además, se comparó con otros estudios realizados en el cacao blanco y el pasu. Para cacao blanco se reporta un menor contenido de flavonoides totales en la semilla $0,84 \pm 0,25 \mu\text{g EQ/mg}$ de extracto ($0,84 \pm 0,25 \text{ mg EQ/g}$ de extracto), versus los $1,61 \text{ mg EQ/g}$ peso seco reportados por

Avendaño Arrazate et al.[15]. Con respecto al pasu, el único estudio realizado por Reyes Mera et al.[10] no reporta un contenido de flavonoides totales.

Las antocianinas son los pigmentos responsables de los colores de las plantas, las flores y las frutas [33]. La estabilidad y los beneficios para la salud de estos compuestos facilitan su uso en la industria alimentaria en una gran variedad de aplicaciones como colorantes alimenticios [101,102]. Por esto, es de interés determinar el contenido de estos compuestos presentes en las frutas del presente estudio. En el cacao blanco se reporta una variedad en el contenido de antocianinas entre las partes del fruto tanto por el método de agitación (cáscara>semilla>pulpa) como por la sonicación (semilla>cáscara>pulpa) como se ve observa en la Tabla 5. De acuerdo a los métodos de extracción realizados, la cáscara y la semilla del cacao blanco se presentan como los mejores candidatos para su uso como colorante alimenticio, tanto por agitación y sonicación respectivamente. En el pasu, el contenido de las antocianinas también fue variado (Pulpa>cáscara>semilla) ver Tabla 6. Entonces, de acuerdo a los resultados obtenidos, la pulpa se presenta como el componente de la fruta con mayor potencial para su aplicación en la industria alimentaria, incluso superando a la cáscara y a la semilla del cacao blanco.

A nivel mundial *Theobroma cacao L.* es la especie más conocida del género *Theobroma* por su uso para la producción del famoso chocolate [103]. El cacao es una rica fuente de una subclase de flavonoides polifenólicos llamados flavanoles (flavan-3-oles o catequinas), donde encontramos dos monómeros principales como la catequina y la epicatequina [104]. Además, el cacao es rico en las metilxantinas como teobromina y cafeína [104,105]. Estos compuestos son de interés por presentar actividad anti-inflamatoria, antioxidante, anticancerígena y protectora cardiovascular, etc [104–107]. El contenido de catequina en el cacao blanco solo fue posible cuantificar en la semilla ($0,35 \pm 0,35$ mg catequina/g extracto) y por el método de sonicación. Por agitación se reporta como compuesto presente en la muestra por debajo del límite de cuantificación (<LC). Esta diferencia en el contenido de catequina entre los métodos puede deberse a los parámetros de extracción establecidos. En la pulpa no se pudo ni siquiera detectar, por lo que puede deberse a la naturaleza misma de esta parte del cacao blanco que no presenta este compuesto. Para el contenido de epicatequina presente en el cacao blanco, solo se logró cuantificar en la cáscara tanto por agitación como por sonicación ($19,59 \pm 1,45$ y $22,77 \pm 1,34$ epicatequina/g extracto, respectivamente). Finalmente, se comparó el contenido de estos flavanoles con otros estudios, donde se encontró que la

epicatequina tampoco se puede encontrar en la semilla del cacao blanco, según lo reportado por Sotero et al.[62].

Las metilxantinas como teobromina y cafeína son una especie de pseudoalcaloides. La mayoría de los métodos de extracción, aprovechan la propiedad (polaridad) de la mayoría de los alcaloides de ser solubles en disolventes orgánicos pero no en agua, y la tendencia contraria de sus sales [108]. Al realizar la extracción con una solución hidroalcohólica (metanol 80%), se obtuvieron este tipo de compuestos. Por la polaridad que presenta el alcohol le permiten disolver a la teobromina y a la cafeína con ciertos grupos funcionales ($-C=O$ y $-CH_3$) [109]. En el presente estudio, se reporta que la semilla de cacao blanco posee un mayor contenido de cafeína y teobromina ($2,82 \pm 0,26$ y $32,27 \pm 0,73$ mg/g extracto, respectivamente), versus los resultados obtenidos por Avendaño Arrazate et al.[15] ($0,32$ y $0,84$ mg/g extracto, respectivamente) y Díaz & Hernández [100] ($0,20 \pm 0,02$ y $0,66 \pm 0,01$ mg/g extracto, respectivamente).

Los fenoles o compuestos fenólicos se caracterizan por su estructura donde al menos está presente un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos. Sus propiedades antioxidantes se deben a la presencia de estos grupos hidroxilos fenólicos, que son capaces de donar un átomo de hidrógeno o un electrón, así como de un sistema aromático conjugado para la deslocalización de electrones no apareados [27]. Existen una variedad de ensayos utilizados para estimar las capacidades antioxidantes de las frutas y que están relacionados con la eliminación de electrones o radicales, como el ensayo del radical DPPH, el radical ABTS y el ensayo FRAP [45].

Los resultados del ensayo DPPH mostraron que la absorbancia disminuyó como resultado de un cambio de color de púrpura a amarillo, ya que el radical ($DPPH^\bullet$) fue eliminado por los antioxidantes (compuestos fenólicos), a través de la donación de hidrógeno, para dar la forma reducida $DPPH-H$ [110]. Siendo los extractos correspondientes a las cáscaras de cacao blanco y del pasu, los que presentaron la coloración más amarilla. Por ende, presentan mayor % de inhibición o eliminación del radical $DPPH^\bullet$. Seguido de las semillas y las pulpas en ambas frutas. Se realizó una correlación entre el contenido fenólico total (CFT) y de flavonoides totales (CDFT) vs el % de inhibición del radical $DPPH^\bullet$, para así poder determinar si el efecto inhibitorio era debido a la presencia de los compuestos fenólicos. De acuerdo al análisis, se encontró una excelente correlación entre CFT y % Inhibición DPPH del cacao blanco ($r^2=0,953$) y del pasu ($r^2=0,955$) Figura 7. Así mismo, se encontró una excelente correlación entre CDFT y %inhibición DPPH del pasu ($r^2=0,977$), sin embargo, no sucedió lo mismo con

el cacao blanco ($r^2=0,526$) Figura 8. Entonces, la inhibición del radical DPPH• con los extractos del cacao blanco se debe sólo al contenido de compuestos fenólicos del tipo no flavonoides. Mientras que, en el pasu, la inhibición del radical DPPH• se debe al contenido de compuestos fenólicos del tipo flavonoides y no flavonoides.

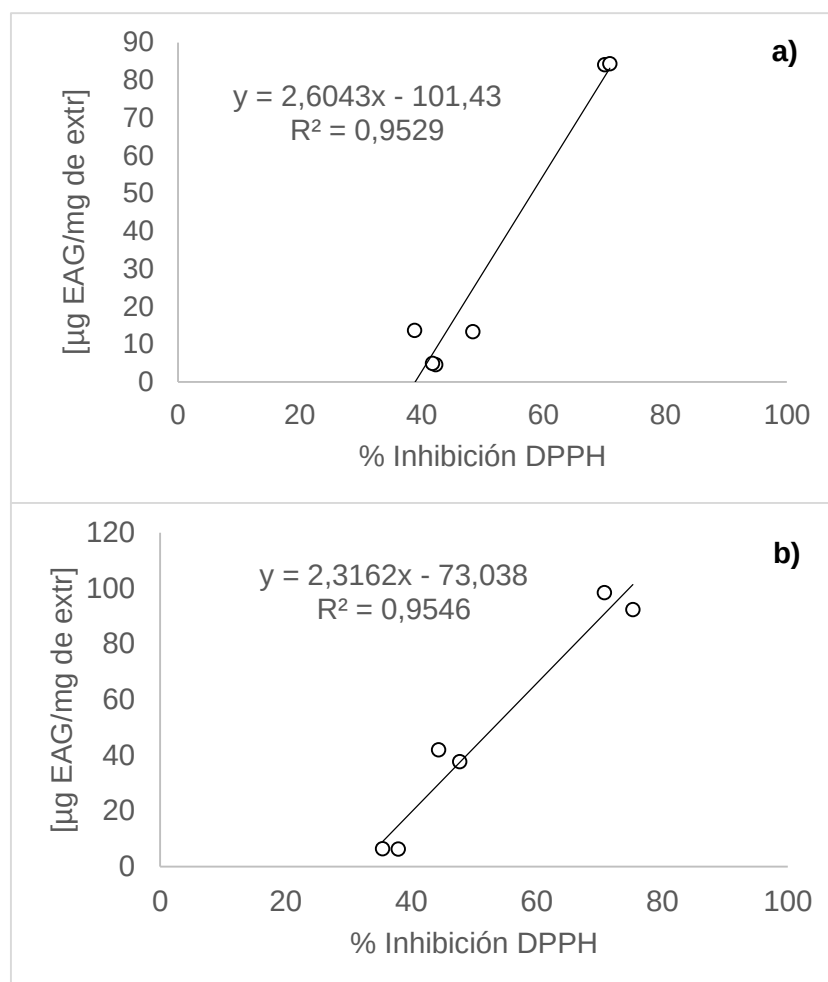


Figura 7-12. Correlación entre el contenido fenólico total y el % de inhibición del radical DPPH del a) cacao blanco y b) pasu.
Realizado por: Loja Bryan, 2022

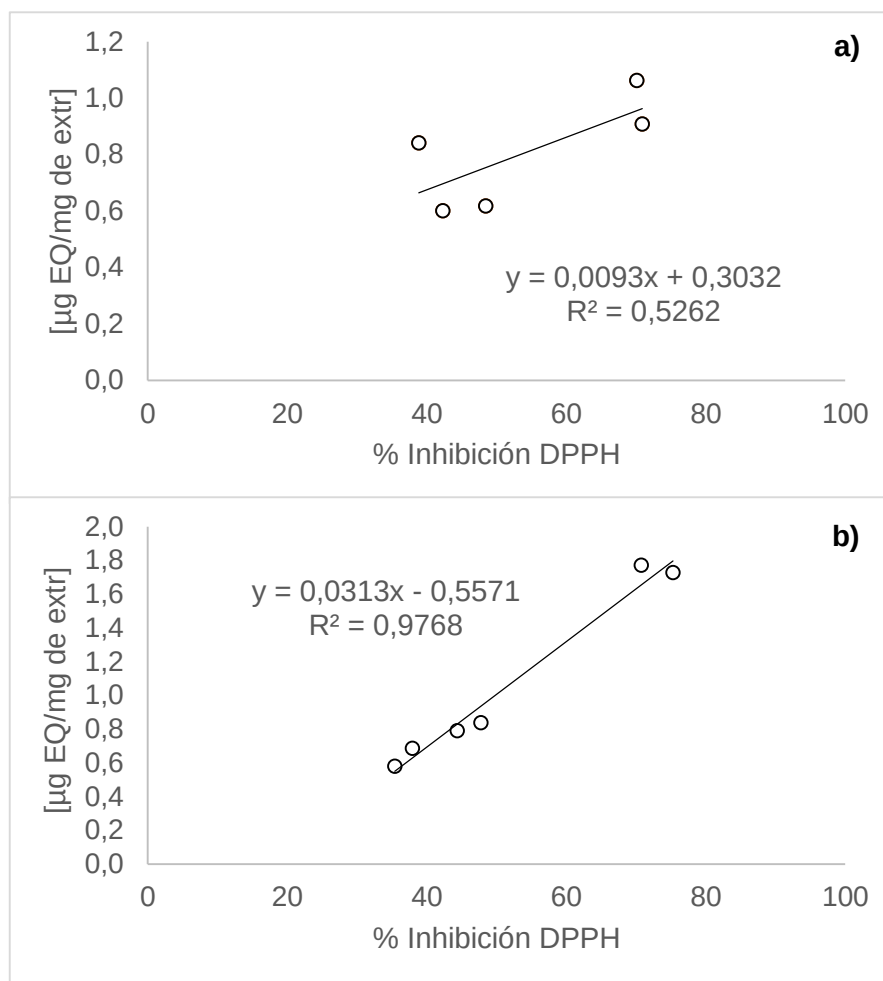


Figura 8-12. Correlación entre el contenido de flavonoides totales y el %de inhibición del radical DPPH del a) cacao blanco y del b) pasu..
Realizado por: Loja Bryan, 2022

En el ensayo del radical ABTS (absorción cromófora azul-verde), la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos, se mide mediante la decoloración del ABTS. [45] Los resultados del ensayo ABTS mostraron que la absorbancia disminuyó como resultado de la decoloración del ABTS, siendo las cáscaras de ambas frutas las que presentaron un mayor % de inhibición del radical. Seguido de los extractos de semilla y pulpa en el caso del cacao blanco, y de los extractos de pulpa y semilla en el pasu. Así mismo, se realizó una correlación entre el contenido fenólico total (CFT) y de flavonoides totales (CDFT) vs el % de inhibición del radical ABTS, para poder determinar si el efecto inhibitorio era debido a la presencia de los compuestos fenólicos. De acuerdo al análisis, se encontró una excelente correlación entre el CFT y % inhibición ABTS del pasu ($r^2=0,944$) ver Figura 9b. Igualmente, se determinó una correlación positiva más no significativa entre CFT y % ABTS del cacao blanco ($r^2=0,881$) Figura 9a. Una mejor correlación existió entre el CDFT y % inhibición ABTS del pasu ($r^2=0,983$) en la Figura 10b, así como también se observó una correlación positiva entre CDFT y %inhibición

ABTS del cacao blanco ($r^2=0,8167$) Figura 10a. Entonces, al igual que el ensayo DPPH, la inhibición del radical ABTS por parte de los extractos del cacao blanco y el pasu se debe al contenido de los compuestos fenólicos (flavonoides y no flavonoides).

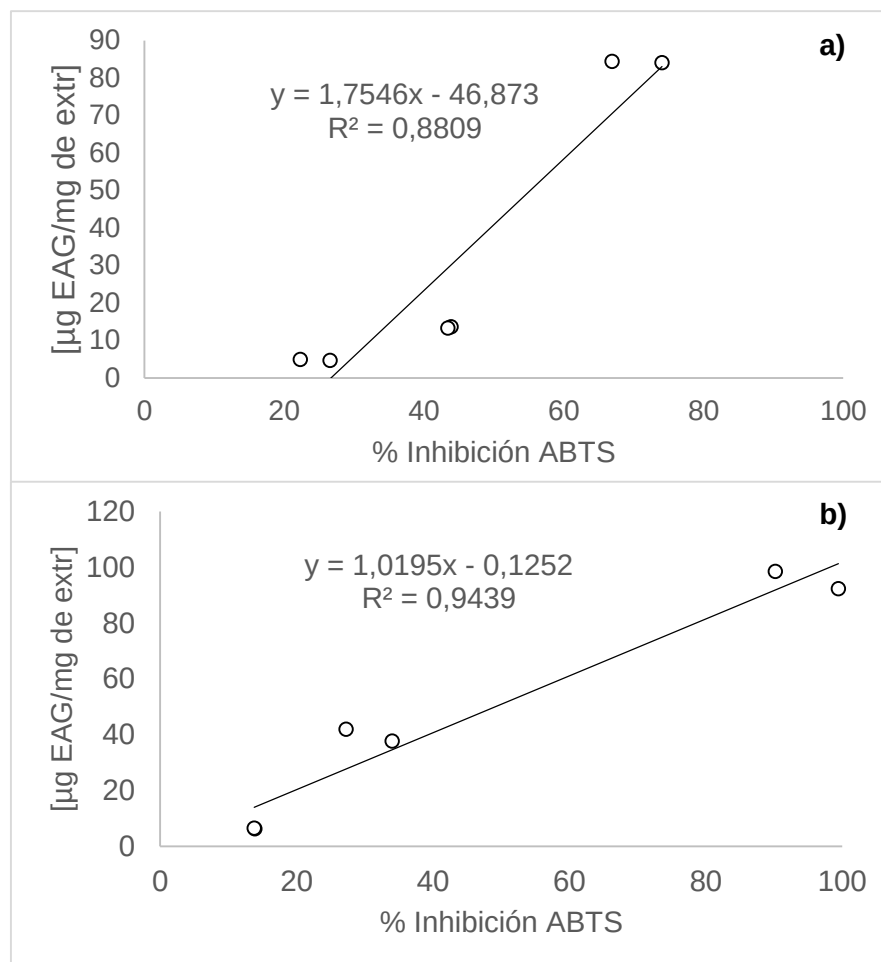


Figura 9-12. Correlación entre el contenido fenólico total y el % de inhibición del radical ABTS del a) cacao blanco y del b) pasu.
Realizado por: Loja Bryan, 2022

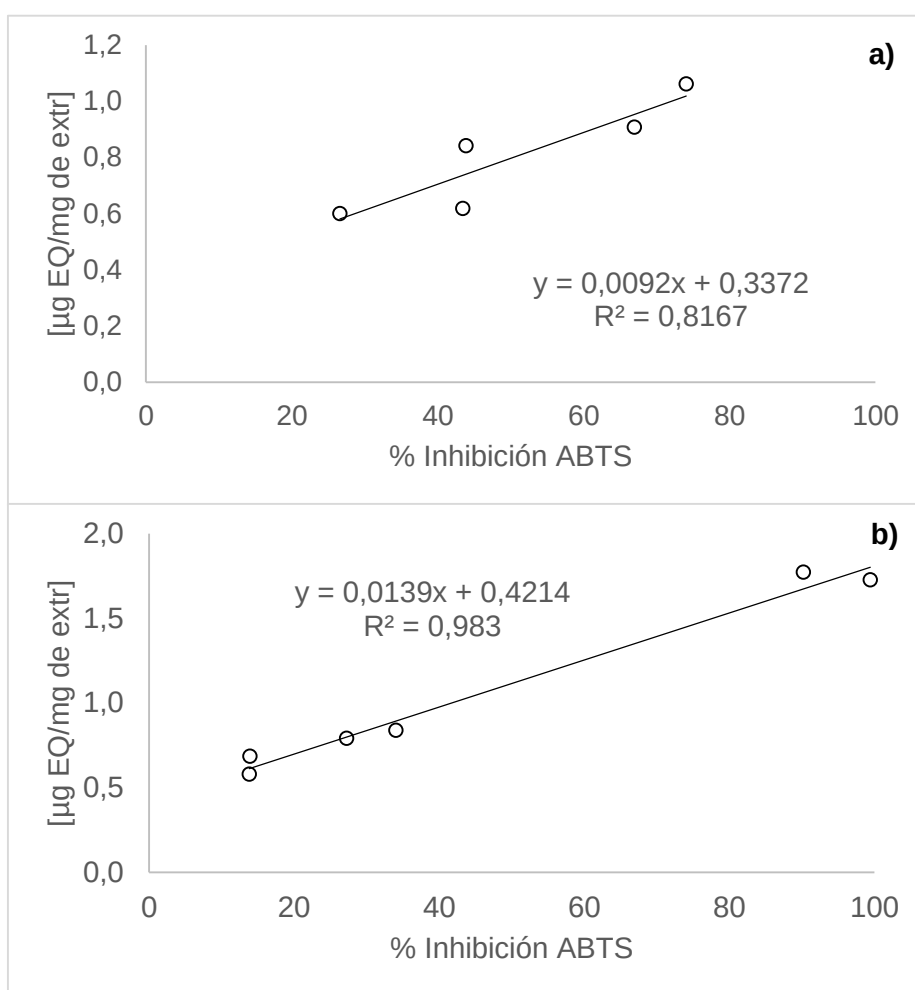


Figura 10-12. Correlación entre el contenido de flavonoides totales y el % de inhibición del radical ABTS del a) cacao blanco y del b) pasu .

Realizado por: Loja Bryan, 2022

El ensayo del poder férrico reductor/antioxidante (FRAP) se da a partir del complejo Fe^{3+} -TPTZ formado, el cual es reducido a la forma Fe^{2+} por un antioxidante en condiciones ácidas.[45] La reducción del Fe^{3+} a Fe^{2+} se refleja a través de un color azul intenso. Por lo tanto, el efecto antioxidante (capacidad reductora) se evalúa controlando la formación de un complejo Fe^{2+} -TPTZ por espectrofotometría. Los resultados del ensayo FRAP mostraron que las cáscaras tanto del cacao blanco como las del pasu poseen mayor poder reductor. Seguido de los extractos de semilla y pulpa en el caso del cacao blanco, y de los extractos de pulpa y semilla en el pasu. Se realizó una correlación entre el contenido fenólico total (CFT) y de flavonoides totales (CDFT) vs el poder férrico reductor de las muestras. De acuerdo al análisis, se encontró una buena correlación entre el CFT y poder férrico reductor de los extractos del cacao blanco ($r^2=0,9349$) ver Figura 11a. Sin embargo, no se observó ninguna correlación entre el

CFT y poder férrico reductor de los extractos del pasu ($r^2=0,1715$) Figura 11b. Por el lado del contenido de flavonoides totales vs el poder férrico reductor, se observó una leve correlación con los extractos del cacao blanco ($r^2=0,1715$) Figura 12a, más con los extractos del pasu no se observó correlación alguna ($r^2=0,1715$) Figura 12b. Entonces, poder férrico reductor por parte de los extractos del cacao blanco se debe por la presencia principalmente por los compuestos fenólicos del tipo no flavonoides, y muy escasamente por la presencia de los compuestos fenólicos del tipo flavonoides. En el pasu no se pudo determinar si el poder férrico reductor de los extractos se debía por la presencia de compuestos fenólicos del tipo flavonoides y no flavonoides. Pero según Reyes Mera [10], en extractos metanólicos también podemos encontrar otros compuestos antioxidantes del tipo lipofílicos como tocoferoles, clorofilas y carotenoides; a los cuales se les podría otorgar el poder férrico reductor.

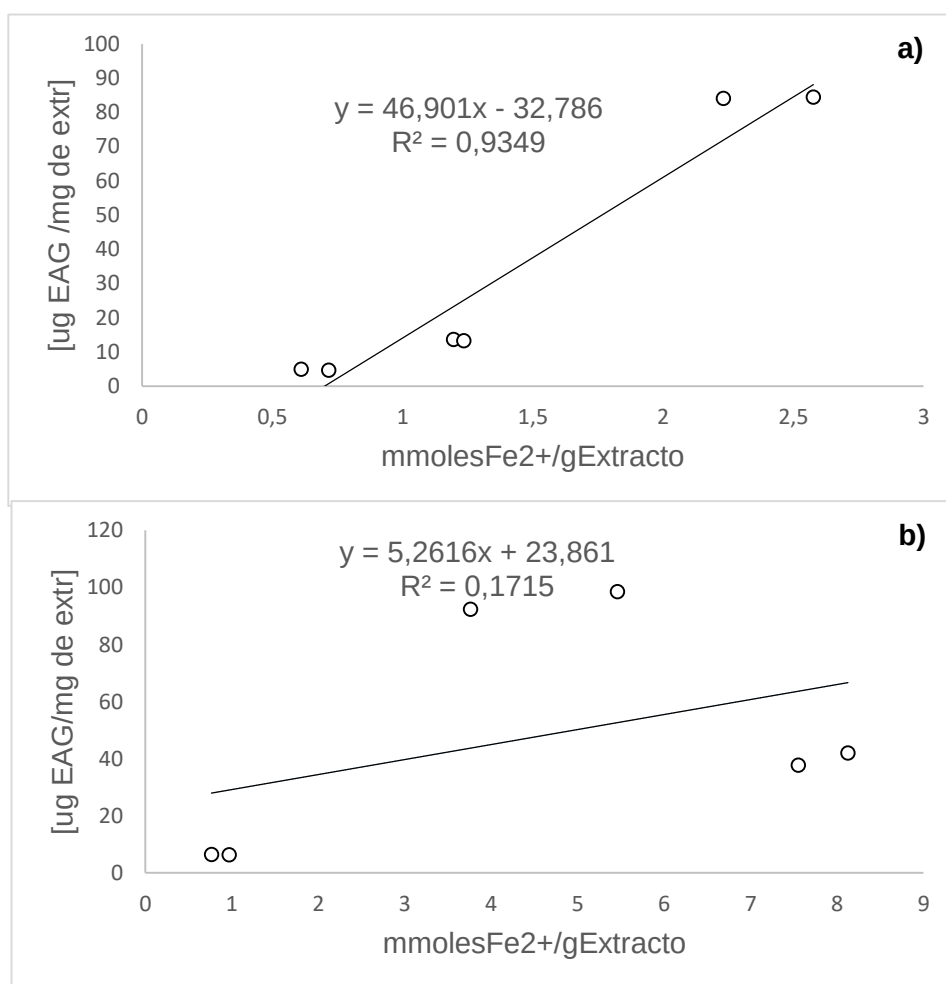


Figura 11-12. Correlación entre el contenido de fenoles totales y el poder férrico reductor/antioxidante (FRAP) del a) cacao blanco y b) pasu
Realizado por: Loja Bryan, 2022

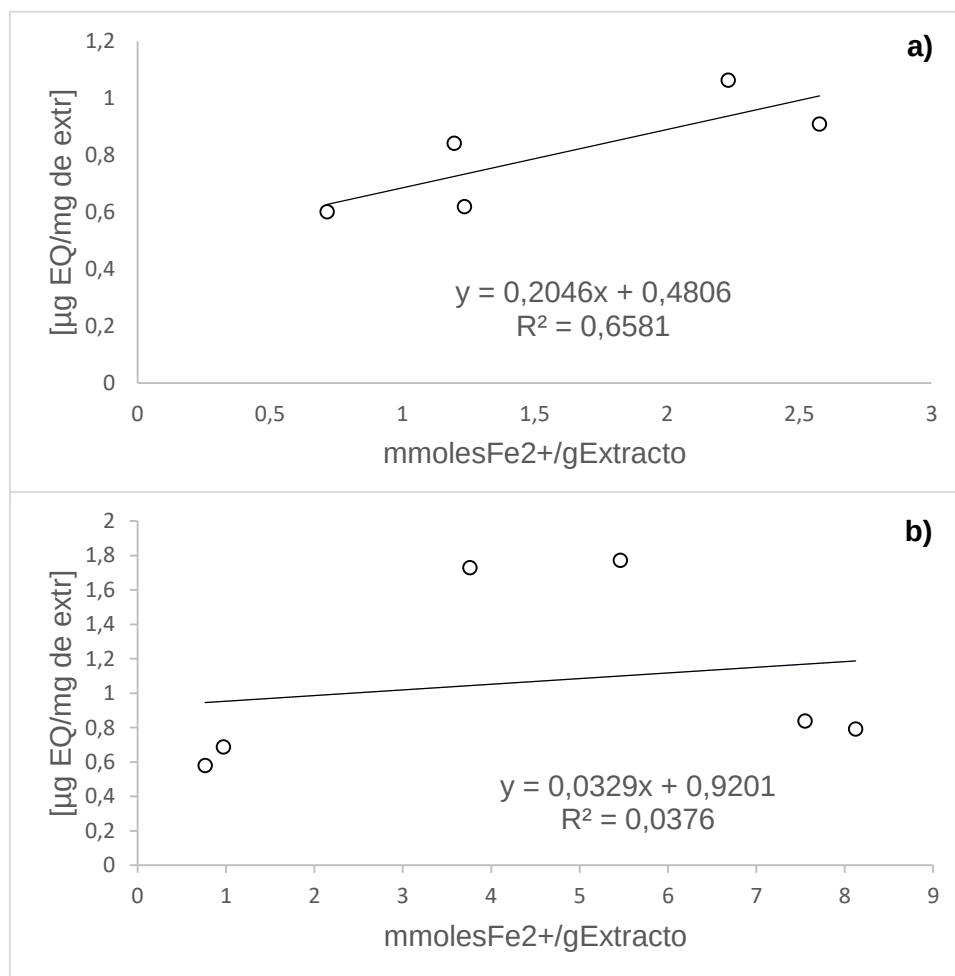


Figura 12-12. Correlación entre el contenido de flavonoides totales y el poder férrico reductor/antioxidante (FRAP) del a) cacao blanco y b) pasu
Realizado por: Loja Bryan, 2022

El concepto de concentración inhibitoria media máxima (IC50) se utiliza ampliamente en el mundo farmacéutico como medida de la eficacia en la inhibición de funciones biológicas o bioquímicas [111]. Para esta ocasión, un valor bajo de IC50 significa una mayor actividad antioxidante por parte de la muestra analizada. Para determinar los valores de IC50, se realizó un barrido de todos los extractos a una misma concentración (100 $\mu\text{g/mL}$). A partir de los valores obtenidos en % de inhibición tanto para el radical DPPH como ABTS, se plantearon los posibles puntos de las curvas dosis-respuestas correspondientes. De este modo, nuevamente las cáscaras de cacao blanco y pasu presentaron las mejores propiedades antioxidantes, al reportar valores más bajos de IC50 ante los radicales DPPH y ABTS ver Tabla 9. Además, los extractos de semilla del cacao frente al radical ABTS reportaron valores de IC50 alrededor de 614 $\mu\text{g/mL}$ (9

veces el IC50 de la cáscara). Mientras que los extractos de la pulpa de cacao blanco reportaron valores de IC50 alrededor de 2111 $\mu\text{g/mL}$ (30 veces el IC50 de la cáscara). Así mismo, los extractos de la pulpa del pasu frente al radical ABTS reportaron un valor promedio de IC50 de 185,5 $\mu\text{g/mL}$ (aprox.6 veces el IC50 de la cáscara). Mientras que, los extractos de la semilla del pasu reportaron un valor promedio de IC50 de 2450 $\mu\text{g/mL}$ (aprox.75 veces el IC50 de la cáscara). Por otro lado, los extractos de la pulpa del pasu frente al radical DPPH mostraron un valor promedio de 209,2 $\mu\text{g/mL}$ (aprox.8 veces el IC50 de la cáscara). Los otros extractos que no reportaron un valor de IC50, se debió a que entre los rangos de concentración propuestos para establecer un IC50 no se observó una relación directamente proporcional (dosis-respuesta). Además, en la Tabla 9 se puede observar valores muy altos de IC50, lo que nos indica que se requiere una gran cantidad de extracto para exhibir una actividad antioxidante considerable (50% de inhibición) y que el extracto correspondiente no presenta una gran cantidad de compuestos antioxidantes ver Tabla 2 y 3.

La búsqueda de antioxidantes de origen natural, nos ha permitido identificar nuevos recursos naturales que pueden formularse para obtener nutraceuticos. Nutraceutico es un portmanteau de “nutriente” y “farmaceutico”, incluye todos los alimentos que, al consumirlos, proporcionan beneficios tanto nutricionales como para la salud. [32] Según Maurya et al.[53], los nutraceuticos pueden clasificarse en función de su origen, uso y métodos de preparación, tales como: alimentos funcionales, suplementos dietéticos, alimentos medicos, fibras dietéticas o forraje, farmaceuticos, prebióticos y probióticos. Este tipo de productos tienen una acción multidireccional y contienen una baja concentración de componentes activos en comparación con los productos farmaceuticos. [53]

Los resultados de la cromatografía líquida revelaron un total de 12 metabolitos ver tabla 11. Entre los cuales, presentan efectos inhibidores de la α -glucosidasa y DPP4, antioxidante, antidiabético, neuroprotectores, anti-Alzheimer, antiobesidad, antialérgico, analgésico, antitumoral. Además, de presentar propiedades para protección cardiovascular y cerebrovascular, antienvjecimiento cutáneo, como adyuvantes y hasta para tratar el COVID-19.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en todos los ensayos realizados, las cáscaras del cacao blanco y del pasu presentaron el mayor contenido fenólico total y de flavonoides totales. Así mismo, mostraron los mayores % de inhibición de los radicales DPPH y ABTS y los menores valores de IC50. Por todo esto, se concluye que las cáscaras de ambas frutas presentan un alto potencial antioxidante y se proponen como buenos candidatos para una futura aplicación nutracéutica.

Para futuros estudios se recomienda realizar un análisis comparativo del contenido fenólico total y los diferentes estados de domesticación de las frutas.

Se obtuvo una correlación positiva entre el contenido fenólico total y de flavonoides totales con la inhibición de los radicales DPPH y ABTS. Sin embargo, para el ensayo FRAP sólo los extractos del cacao blanco presentaron una correlación positiva entre el contenido fenólico total y el poder férrico reductor. Además, se recomienda analizar la posible correlación entre los antioxidantes lipofílicos presentes en el pasu y el poder férrico reductor.

Se propone al extracto de la pulpa del pasu para una aplicación como colorante alimenticio por su alto contenido de antocianinas. Además, para una futura aplicación nutracéutica de los extractos frutales, se recomienda usar como agente extractor el etanol por su grado GRAS o agua. También, concluir que no se observaron muchas diferencias significativas entre los métodos de extracción de agitación y sonicación en los ensayos de cuantificación de fenoles y flavonoides. Sin embargo, en los ensayos antioxidantes si se pudo observar.

Con respecto al contenido de metilxantinas (teobromina y cafeína), se reporta que la semilla de cacao blanco posee un mayor contenido de cafeína y teobromina en comparación a otros estudios realizados.

Finalmente, se identificó un total de 12 metabolitos que han sido reportados con actividad farmacéutica. Y se recomienda verificar la presencia de estos compuestos mediante el uso de estándares para mayor certeza.

REFERENCIAS

1. Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000;403: 853–858. doi:10.1038/35002501
2. Rondón M, García I, Cornejo X, Rojas J, Terán W. Phytochemical screening and antioxidant activity of seven medicinal plants species from Ecuador. *Pharmacologyonline*. 2015;3: 19–28.
3. Aguinda Vargas J. Estudio etnobotánico de especies vegetales en las explotaciones agropecuarias del cantón Santa Clara. Universidad Estatal Amazónica. 2015.
4. De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía M, Balslev H. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. Primera Ed. De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía M, Balslev H, editors. Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador. Quito & Aarhus: Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.; 2008. Available: [https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/10125/47330/de la Torre et al. 2008 Encyclopedia of useful plants of Ecuador.pdf](https://scholarspace.manoa.hawaii.edu/bitstream/10125/47330/de%20la%20Torre%20et%20al.%202008%20Encyclopedia%20of%20useful%20plants%20of%20Ecuador.pdf)
5. Vargas-Tierras YB, Prado-Beltrán JK, Nicolalde-Cruz JR, Casanoves F, De Melo Virginio-Filho E, Viera-Arroyo WF. Characterization and role of Amazonian fruit crops in family farms in the provinces of Sucumbíos and Orellana (Ecuador). *Corpoica Cienc y Tecnol Agropecu*. 2018;19: 501–515. doi:10.21930/RCTA.VOL19_NUM3_ART:812
6. Bautista Lozada A, Parra Rondinel F, Espinosa-García FJ. Efectos de la Domesticación de Plantas en la Diversidad Fitoquímica. In: Rojas JC, Malo EA, editors. *Temas Selectos en Ecología de Insectos*. Mexico: El Colegio de la Frontera Sur; 2012. pp. 253–267. Available: https://www.academia.edu/2176166/Bautista_Lozada_A_F_Parra_Rondinel_y_F_J_Espinosa_García_2012_Efectos_de_la_Domesticación_de_Plantas_en_la_Diversidad_Fitoquímica_253_267_En_J_C_Rojas_y_E_A_Malo_eds_Temas_Selectos_en_Ecología_Química_de_Insectos_El_Colegi
7. Clement CR, de Cristo-Araújo M, d'Eeckenbrugge GC, Pereira AA, Picanço-Rodrigues D. Origin and domestication of native Amazonian crops. *Diversity*. 2010. doi:10.3390/d2010072
8. González Collaguazo J, Luzuriaga Gutiérrez V. Estudio botánico y fitoquímico del fruto de *Gustavia macarenensis*, de la provincia de Orellana, Ecuador. Bachelor's thesis. Universidad Politécnica Salesiana. 2020. Available: <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18503%0Ahttp://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
9. Pérez AJ, Hernández C, Romero-Saltos H, Valencia R. *Gustavia macarenensis*. In: Árboles emblemáticos de Yasuní [Internet]. 2018 [cited 25 Jan 2022]. Available: [https://bioweb.bio/loraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Gustavia macarenensis](https://bioweb.bio/loraweb/arbolesyasuni/FichaEspecie/Gustavia%20macarenensis)
10. Reyes Mera JJ, Abreu-Naranjo R, Alvarez-Suarez JM, Viafara D. Chemical characterization, fatty acid profile and antioxidant activity of *Gustavia macarenensis* fruit mesocarp and its oil from the amazonian region of Ecuador as an unconventional source of vegetable oil. *Grasas y Aceites*. 2019;70: 1–9. doi:10.3989/gya.0569181

11. Ponce-Sánchez J, Zurita-Benavides MG, Peñuela MC. Reproductive ecology of white cacao (*Theobroma bicolor* Humb. & Bonpl.) in Ecuador, western Amazonia: floral visitors and the impact of fungus and mistletoe on fruit production. *Rev Bras Bot.* 2021;44: 479–489. doi:10.1007/s40415-021-00709-9
12. Lim TK. *Theobroma bicolor*. *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*. 2012. doi:10.1007/978-94-007-2534-8
13. Tropicos. *Theobroma bicolor* Bonpl. In: *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador* [Internet]. 2009 [cited 25 Jan 2022]. Available: <http://legacy.tropicos.org/Name/30400668?projectid=2>
14. Naranjo P, Escaleras R. *La medicina tradicional en el Ecuador*. 1st ed. Naranjo P, Escaleras R, editors. Quito-Ecuador: Corporación Editora Nacional; 1995.
15. Avendaño Arrazate CH, Campos Rojas E, López Palestina CU, Martínez Bolaños M, Caballero Pérez JF, Báez MA, et al. Antioxidant activity in genotypes of *theobroma* spp. (malvaceae) in Mexico. *Rev Biol Trop.* 2021;69: 507–523. doi:10.15517/rbt.v69i2.41626
16. Li Y, Feng Y, Zhu S, Luo C, Ma J, Zhong F. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. *J Food Compos Anal.* 2012;25: 17–23. doi:10.1016/j.jfca.2011.04.010
17. Avila-Sosa R, Montero-Rodríguez AF, Aguilar-Alonso P, Vera-López O, Lazcano-Hernández M, Morales-Medina JC, et al. Antioxidant Properties of Amazonian Fruits: A Mini Review of in Vivo and in Vitro Studies. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/8204129
18. Yahia EM, García-Solís P, MaldonadoCelis ME. Contribution of fruits and vegetables to human nutrition and health. Yahia EM, editor. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Queretaro, Mexico: Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-813278-4.00002-6
19. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*. 2006; 161–172. doi:10.4067/s0718-04622006000200010
20. Pérez Jiménez J. Metodología para la evaluación de ingredientes funcionales antioxidantes. Efecto de Fibra Antioxidante de Uva en status antioxidante y parámetros de riesgo cardiovascular en humanos". Instituto del Frío (CSIC) Departamento de Metabolismo y Nutrición. Universidad Autónoma de Madrid. 2007. Available: https://repositorio.uam.es/bitstream/handle/10486/1671/6494_perez_jimenez_jara.pdf
21. Dudonné et al. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays - *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (ACS Publications). *J Agric Food Chem.* 2009;57: 1768–1774. doi:10.1021/jf803011r
22. Rodríguez L, Lopez L, García M, Jorge U, Lozano T. Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, mora (*Rubus glaucus* B.), Maracuyá (*Passiflora edulis* S.), Guayaba (*Psidium guajava* L.) y Papayuela (*Carica cundinam*. *Alimentos Hoy.* 2010: 35–42. Available: https://acta.org.co/acta_sites/alimentoshoy/index.php/hoy/article/view/45
23. Echavarría A, D'Armas H, Matute-L N-L, Jaramillo C, Rojas de Astudillo L, Benítez R. Evaluación

de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. 2016;9: 29–35.

24. Caroch M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013;51: 15–25. doi:10.1016/j.fct.2012.09.021
25. Rasheed A, Fathima Abdul Azeed R. A Review on Natural Antioxidants. *Tradit Complement Med.* 2019. doi:10.5772/intechopen.82636
26. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97: 55–74. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040
27. Cveji J, Atanacković Krstonosić M, Mikulić M, Miljić U. Polyphenols. *Nutraceutical and Functional Food Components.* 2022. pp. 243–312. doi:10.1016/B978-0-323-85052-0.00012-X
28. Chen L, Teng H, Xie Z, Cao H, Cheang WS, Skalicka-Woniak K, et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: An update on structure–activity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018;58: 513–527. doi:10.1080/10408398.2016.1196334
29. Montero Rodriguez AF. *Compuestos Funcionales Y Aprovechamiento Agroindustrial De Frutas Nativas Amazónicas.* Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. 2018.
30. Tauchen J, Bortl L, Huml L, Miksatkova P, Daskocil I, Marsik P, et al. Phenolic composition, antioxidant and anti-proliferative activities of edible and medicinal plants from the peruvian amazon. *Rev Bras Farmacogn.* 2016;26: 728–737. doi:10.1016/j.bjp.2016.03.016
31. Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Classification of Phenolic Compounds in Plants. *Polyphenols in Plants.* 2019; 263–284. doi:10.1016/b978-0-12-813768-0.00026-8
32. Lin JK, Weng MS. Flavonoids as nutraceuticals. *Sci Flavonoids.* 2006;7: 213–238. doi:10.1007/978-0-387-28822-2_8
33. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: An overview. *J Nutr Sci.* 2016;5. doi:10.1017/jns.2016.41
34. Tsimogiannis DI, Oreopoulou V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2006;7: 140–146. doi:10.1016/j.ifset.2005.09.001
35. Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, et al. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phyther Res.* 2019;33: 2221–2243. doi:10.1002/ptr.6419
36. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;854: 435–442. doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09922.x
37. Bors W, Heller W, Michel C, Saran M. Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* 1990;186: 343–355. doi:10.1016/0076-6879(90)86128-I
38. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and

phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20: 933–956. doi:10.1016/0891-5849(95)02227-9

39. Chen J, Yang J, Ma L, Li J, Shahzad N, Kim CK. Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Sci Rep.* 2020;10: 1–9. doi:10.1038/s41598-020-59451-z
40. Jiménez N, Carrillo-Hormaza L, Pujol A, Álzate F, Osorio E, Lara-Guzman O. Antioxidant capacity and phenolic content of commonly used anti-inflammatory medicinal plants in Colombia. *Ind Crops Prod.* 2015;70: 272–279. doi:10.1016/j.indcrop.2015.03.050
41. Číž M, Čížová H, Denev P, Kratchanova M, Slavov A, Lojek A. Different methods for control and comparison of the antioxidant properties of vegetables. *Food Control.* 2010;21: 518–523. doi:10.1016/j.foodcont.2009.07.017
42. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;53: 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698
43. Resat A, Capanoglu E, Shahidi F. Measure of antioxidant activity and capacity. 2018. Available: <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
44. Mishra R, Singh Bisht S. Antioxidants and their characterization. *J Pharm Res.* 2011;4: 2744–2746. Available: www.jpronline.info
45. Moon J-K, Shibamoto T. Antioxidant assays for plant and food components. *J Agric Food Chem. Bioact Food Proteins Pept Appl Hum Heal.* 2009;57: 1655–1666.
46. Dokki C. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alexandria J Food Sci Technol.* 2014;11: 31–42. doi:10.12816/0025348
47. Oliveira, S; Souza, G.A; Eckert, C.R; Silva, T.A; Edmar Silva Sobra, E.S; Fávero, O.P; Ferreira, M.J.P; Romoff, P; Baader W. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quim Nov.* 2014;37: 497–503.
48. Xiao F, Xu T, Lu B, Liu R. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Front.* 2020;1: 60–69. doi:10.1002/fft2.10
49. Harwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35: 1147–1150. doi:10.1042/BST0351147
50. Tiwari AK, Reddy KS, Radhakrishnan J, Kumar DA, Zehra A, Agawane SB, et al. Influence of antioxidant rich fresh vegetable juices on starch induced postprandial hyperglycemia in rats. *Food Funct.* 2011;2: 521–528. doi:10.1039/c1fo10093a
51. Villa-Rodriguez JA, Palafox-Carlos H, Yahia EM, Ayala-Zavala JF, Gonzalez-Aguilar GA. Maintaining Antioxidant Potential of Fresh Fruits and Vegetables After Harvest. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;55: 806–822. doi:10.1080/10408398.2012.685631
52. Zhao J. Nutraceuticals, Nutritional Therapy, Phytonutrients, and Phytotherapy for Improvement of Human Health: A Perspective on Plant Biotechnology Application. *Recent Pat Biotechnol.* 2007;1: 75–97. doi:10.2174/187220807779813893

53. Maurya AP, Chauhan J, Yadav DK, Gangwar R, Maurya VK. Nutraceuticals and their impact on human health. In: Chukwuebuka Egbuna, Mishra AP, Megh R. Goyal, editors. Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders. Elsevier Inc.; 2021. pp. 229–254. doi:10.1016/b978-0-12-820284-5.00011-3
54. Torres B, Jadán Maza O, Aguirre P, Hinojosa L, Gunter S. The Contribution of Traditional Agroforestry to Climate Change Adaptation in the Ecuadorian Amazon: The Chakra System. In: Filho WL, editor. Handbook of Climate Change Adaptation. 2015. pp. 1973–1994. doi:10.1007/978-3-642-38670-1
55. Paredes N, Pico J, Caicedo C, Lima L, Chimbo P, Monteros-Altamirano Á. Biodiversidad de Especies Asociadas a los Sistemas de Producción de Cacao (*Theobroma cacao* L.). Memorias del Primer Simposio Internacional Innovaciones Tecnológicas para Fortalecer la Cadena de Cacao en la Amazonía Ecuatoriana. 2020: 8–19.
56. Lopes Alves JJ, Dias MI, Barreira JCM, Barros L, Resende O, Ribeiro Aguiar AC, et al. Phenolic Profile of *Croton urucurana* Baill. Leaves, stems and bark: Pairwise influence of drying temperature and extraction solvent. *Molecules*. 2020;25: 1–12. doi:10.3390/molecules25092032
57. Guachamin M, Ponce J, Feijóo K, Vicente K. Chakra circular sostenible de producción alimentaria. 2018.
58. Pradeep Kumar P, Acharya B, Dutta S, Saha S, Hazra P, Brati Acharya C, et al. Comparative expression of different characters in cultivated tomato and its wild relatives. *J Pharmacogn Phytochem*. 2019;8: 3410–3419.
59. Fernandez AR, Sáez A, Quintero C, Gleiser G, Aizen MA. Intentional and unintentional selection during plant domestication: herbivore damage, plant defensive traits and nutritional quality of fruit and seed crops. *New Phytol*. 2021;231: 1586–1598. doi:10.1111/nph.17452
60. Chacón-Fuentes M, Parra L, Rodríguez-Saona C, Seguel I, Ceballos R, Quiroz A. Domestication in murtilla (*Ugni molinae*) reduced defensive flavonol levels but increased resistance against a native herbivorous insect. *Environ Entomol*. 2015;44: 627–637. doi:10.1093/ee/nvv040
61. Zurita Montenegro S, Navarrete Zambrano H. Lineamientos de consumo y fuentes de obtención de los frutos nativos, Pengá (*Garcinia macrophylla* MART), Sachi (*Gustavia macarenensis* PHILIPSON) y Shawi (*Plinia* sp .) en dos comunidades de la amazonía ecuatoriana. *Rev Etnobiología*. 2019;17: 61–73.
62. Sotero V, Maco M, Vela J, Merino C, Dávila É, Garcia D. Evaluación de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos en pulpa y semillas de cuatro frutales amazónicos de la familia Sterculiaceae. *Rev Soc Quim Peru*. 2011;77: 66–74.
63. Werner N, Tamayo G. Bioprospecting. *Encyclopedia of Biodiversity*. 2001. pp. 471–488. Available: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/342/3421366008/html/>
64. Montenegro, H. E., & Pineda D. Aislamiento E Identificación De Terpenos Presentes En Extractos De Hojas Maduras De *Myrospermum frutescens*. *Rev Investig la Univ Panamá*. 2018;28: 7–21. Available: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/342/3421366008/html/>
65. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS,

- DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal.* 2006;19: 669–675. doi:10.1016/j.jfca.2006.01.003
66. Oreopoulou A, Tsimogiannis D, Oreopoulou V. Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants: An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. 2nd ed. *Polyphenols in Plants*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/b978-0-12-813768-0.00025-6
 67. Tomaz I, Huzanić N, Preiner D, Stupić D, Andabaka Ž, Maletić E, et al. Extraction Methods of Polyphenol From Grapes: Extractions of Grape Polyphenols. *Polyphenols in Plants*. 2019; 151–167. doi:10.1016/b978-0-12-813768-0.00010-4
 68. Sánchez-Moreno C, Larrauri J, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric.* 1998;76: 270–276. Available: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199802%2976%3A2%3C270%3A%3AAID-JSFA945%3E3.0.CO%3B2-9%0Ahttp://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199802\)76:2%3C270::AID-JSFA945%3E3.0.CO;2-9](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/%28SICI%291097-0010%28199802%2976%3A2%3C270%3A%3AAID-JSFA945%3E3.0.CO%3B2-9%0Ahttp://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199802)76:2%3C270::AID-JSFA945%3E3.0.CO;2-9)
 69. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26: 1231–1237.
 70. Benzie IF, Strain J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem.* 1996; 70–76.
 71. Medina MB. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J Agric Food Chem.* 2011;59: 1565–1571. doi:10.1021/jf103711c
 72. Wang W, Li J, Zhang H, Wang X, Fan J, Zhang X. Phenolic compounds and bioactivity evaluation of aqueous and methanol extracts of *Allium mongolicum* Regel. *Food Sci Nutr.* 2019;7: 779–787. doi:10.1002/fsn3.926
 73. Bessada SMF, Barreira JCM, Barros L, Ferreira ICFR, Oliveira MBPP. Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Ind Crops Prod.* 2016;89: 45–51. doi:10.1016/j.indcrop.2016.04.065
 74. Risner CH. Simultaneous determination of theobromine, (+)-catechin, caffeine, and (-)-epicatechin in standard reference material baking chocolate 2384, cocoa, cocoa beans, and cocoa butter. *J Chromatogr Sci.* 2008;46: 892–899. doi:10.1093/chromsci/46.10.892
 75. Jiang S, Chen C, Dong Q, Shao Y, Zhao X, Tao Y, et al. Alkaloids and phenolics identification in fruit of *Nitraria tangutorum* Bobr. by UPLC-Q-TOF-MS/MS and their α -glucosidase inhibitory effects in vivo and in vitro. *Food Chem.* 2021;364. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130412
 76. Fuda H, Miyanaga S, Furukawa T, Umetsu S, Joko S, Roan Y, et al. Flazin as a Promising Nrf2 Pathway Activator. *J Agric Food Chem.* 2019;67: 12844–12853. doi:10.1021/acs.jafc.9b04600
 77. Yang Z, Liu C, Xiang L, Zheng Y. Phenolic alkaloids as a new class of antioxidants in *Portulaca oleracea*. *Phyther Res.* 2009;23: 1032–1035. doi:10.1002/ptr.2742
 78. Characterization UM, Ahn M. Comparative Studies of *Fraxinus* Species from Korea. 2020.
 79. Xu WH, Zhao P, Wang M, Liang Q. Naturally occurring furofuran lignans: structural diversity and

- biological activities. *Nat Prod Res.* 2019;33: 1357–1373. doi:10.1080/14786419.2018.1474467
80. She GM, Zhang YJ, Yang CR. Phenolic constituents from *Balanophora laxiflora* with DPPH radical-scavenging activity. *Chem Biodivers.* 2009;6: 875–880. doi:10.1002/cbdv.200800139
 81. Gao D, Li Q, Li Y, Liu Z, Fan Jy, Liu Z, et al. Antidiabetic and Antioxidant Effects of Oleanolic Acid from *Ligustrum lucidum* Ait in Alloxan-induced Diabetic Rats. *Phyther Res.* 2009;22: 1257–1262. doi:10.1002/ptr.2603
 82. Singh R, Kanwar SS, Sood PK, Nehru B. Beneficial effects of folic acid on enhancement of memory and antioxidant status in aged rat brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2011;31: 83–91. doi:10.1007/s10571-010-9557-1
 83. Enderami A, Zarghami M, Darvishi-Khezri H. The effects and potential mechanisms of folic acid on cognitive function: a comprehensive review. *Neurol Sci.* 2018;39: 1667–1675. doi:10.1007/s10072-018-3473-4
 84. Chitayat D, Matsui D, Amitai Y, Kennedy D, Vohra S, Rieder M, et al. Folic acid supplementation for pregnant women and those planning pregnancy: 2015 update. *J Clin Pharmacol.* 2016;56: 170–175. doi:10.1002/jcph.616
 85. Qi W, Chen F, Sun J, Simpkins JW, Yuan D. Isolation and identification of twelve metabolites of isocorynoxine in rat urine and their neuroprotective activities in HT22 cell assay. *Planta Med.* 2015;81: 46–55. doi:10.1055/s-0034-1383357
 86. Zeng P, Wang XM, Ye CY, Su HF, Tian Q. The main alkaloids in *uncaria rhynchophylla* and their anti-Alzheimer's disease mechanism determined by a network pharmacology approach. *Int J Mol Sci.* 2021;22. doi:10.3390/ijms22073612
 87. Tan Q, Zhang J. Evodiamine and its role in chronic diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2016;929: 315–328. doi:10.1007/978-3-319-41342-6_14
 88. Gong G, Guan YY, Zhang ZL, Rahman K, Wang SJ, Zhou S, et al. Isorhamnetin: A review of pharmacological effects. *Biomed Pharmacother.* 2020;128. doi:10.1016/j.biopha.2020.110301
 89. Xin Z, Wu X, Ji T, Xu B, Han Y, Sun M, et al. Bakuchiol: A newly discovered warrior against organ damage. *Pharmacol Res.* 2019;141: 208–213. doi:10.1016/j.phrs.2019.01.001
 90. Dhaliwal S, Rybak I, Ellis SR, Notay M, Trivedi M, Burney W, et al. Prospective, randomized, double-blind assessment of topical bakuchiol and retinol for facial photoageing. *Br J Dermatol.* 2019;180: 289–296. doi:10.1111/bjd.16918
 91. Zabidi NA, Ishak NA, Hamid M, Ashari SE, Mohammad Latif MA. Inhibitory evaluation of *Curculigo latifolia* on α -glucosidase, DPP (IV) and in vitro studies in antidiabetic with molecular docking relevance to type 2 diabetes mellitus. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2021;36: 109–121. doi:10.1080/14756366.2020.1844680
 92. Vivek-Ananth, R.P. .; Abhijit, R.; Nithin R. HSB. ASISI of PNP, To, Inhibitors of Human Proteases Key to SARS-CoV-2 infection. *Molecules.* 2020, 25 3822. In Silico Identification of Potential Natural Product Inhibitors of Human Proteases Key to SARS-CoV-2 Infection. *Molecules.* 2020;25: 3822.
 93. Cheng L, Wang F, Zhang SB, You QY. Network Pharmacology Integrated Molecular Docking

Reveals the Anti-COVID-19 and SARS Mechanism of Fufang Banlangen Keli. *Nat Prod Commun.* 2021;16. doi:10.1177/1934578X20988420

94. Yoshikawa M, Murakami T, Komatsu H, Matsuda H. Medicinal foodstuffs. XII. Saponin constituents with adjuvant activity from hyacinth bean, the seeds of *Dolichos lablab* L. (1) Structures of lablabosides A, B, and C. *Chem Pharm Bull.* 1977;57: 364–370. Available: <http://www.mendeley.com/research/geology-volcanic-history-eruptive-style-yakedake-volcano-group-central-japan/>
95. Ueda M, Sasaki K, Inaba K, Shimabayashi Y. Variation of Total Polyphenol and Polyphenol Oxidase Activity during Maturation of Mango Fruit (*Mangifera indica* L. 'Irwin') Cultured in a Plastic House. *Food Sci Technol Res.* 2000;6: 59–61. doi:10.3136/fstr.6.59
96. Mubarak S, Wicaksono FY, Budiarto R, Rahmat BPN, Khoerunnisa SA. Metabolite correlation with antioxidant activity in different fruit maturation stages of *Physalis peruviana*. *Biodiversitas.* 2021;22: 2743–2749. doi:10.13057/biodiv/d220536
97. Eid NMS, Al-Awadi B, Vauzour D, Oruna-Concha MJ, Spencer JPE. Effect of cultivar type and ripening on the polyphenol content of date palm fruit. *J Agric Food Chem.* 2013;61: 2453–2460. doi:10.1021/jf303951e
98. Brglez Mojzer E, Knez Hrncić M, Škerget M, Knez Ž, Bren U. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules.* 2016;21: 901. doi:10.3390/molecules21070901
99. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem.* 2003;51: 2866–2887. doi:10.1021/jf026182t
100. Díaz RO, Hernández MS. Theobromas from the Colombian Amazon: A healthy alternative. *Inf Technol.* 2020;31: 3–10. doi:10.4067/S0718-07642020000200003
101. Pojer E, Mattivi F, Johnson D, Stockley CS. The case for anthocyanin consumption to promote human health: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2013;12: 483–508. doi:10.1111/1541-4337.12024
102. Giusti MM, Wrolstad RE. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem Eng J.* 2003;14: 217–225. doi:10.1016/S1369-703X(02)00221-8
103. Nair KP. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Tree Crops.* Springer, Cham; 2021. pp. 153–210. doi:10.2307/1307684
104. Langer S, Marshall LJ, Day AJ, Morgan MRA. Flavanols and methylxanthines in commercially available dark chocolate: A study of the correlation with nonfat cocoa solids. *J Agric Food Chem.* 2011;59: 8435–8441. doi:10.1021/jf201398t
105. Ashihara H, Mizuno K, Yokota T, Crozier A. Xanthine Alkaloids: Occurrence, Biosynthesis, and Function in Plants. *Progress in the chemistry of organic natural products.* 2017. doi:10.1007/978-3-319-49712-9_1
106. Cadoná FC, Dantas RF, de Mello GH, Silva-Jr FP. Natural products targeting into cancer hallmarks: An update on caffeine, theobromine, and (+)-catechin. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2021;0: 1–20.

doi:10.1080/10408398.2021.1913091

107. Martínez-Pinilla E, Oñatibia-Astibia A, Franco R. The relevance of theobromine for the beneficial effects of cocoa consumption. *Front Pharmacol.* 2015;6: 1–6. doi:10.3389/fphar.2015.00030
108. Adejoke HT, Louis H, Amusan OO, Apebende G. A Review on Classes, Extraction, Purification and Pharmaceutical Importance of Plants Alkaloid. *J Med Chem Sci Orig Artic J Med Chem Sci.* 2019;2019: 130–139. Available: <http://jmchemsci.com><http://jmchemsci.com>
109. Nguyen VT, Nguyen NH. Proximate Composition, Extraction, and Purification of Theobromine from Cacao Pod Husk (*Theobroma Cacao* L.). *Technologies.* 2017;5: 14. doi:10.3390/technologies5020014
110. Rufino MSM, Fernandes FAN, Alves RE, de Brito ES. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chem.* 2009;114: 693–695. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.098
111. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA. The IC 50 Concept Revisited. *Curr Top Med Chem.* 2012;12: 1282–1290.

ANEXOS

Anexo 1-2: Extractos metanólicos de cacao blanco y pasu, obtenidos mediante los métodos de extracción agitación y sonicación.



Anexo 2-2: Obtención de los extractos metanólicos

Fruta	Método de Extracción	Parte de la fruta	Peso (g)*	Metanol 80% (mL)	Extracto obtenido (g)**
Cacao Blanco	Agitación	Semilla	17,0435	85	0,8019
		Pulpa	14,0009	70	5,9772
		Cáscara	12,7650	65	1,1821
	Sonicación	Semilla	17,0930	85	0,9240
		Pulpa	14,0803	70	5,5619
		Cáscara	12,8256	65	1,2719
Pasu	Agitación	Semilla	12,16404	80	0,6343
		Pulpa	7,26124	100	1,4603
		Cáscara	7,8256	120	1,8785
	Sonicación	Semilla	12,17599	80	0,6177
		Pulpa	7,38417	100	1,2790
		Cáscara	7,7821	120	1,6206

* Muestras previamente liofilizadas.

** Muestras concentradas en el rotavaporador (solvente eliminado).