Biotecnia
Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud
http://biotecnia.unison.mx
Universidad de Sonora
ISSN: 1665-1456

Artículo Original

Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de polifenoles de semillas de macambo (*Theobroma bicolor*)

Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of polyphenols from macambo seeds (*Theobroma bicolor*)

Loguard Smith Rojas-Uribe [1], Marlis Nicole Bones-Choez[1], Ángel Virgilio Cedeño-Moreira[2], Luis Humberto Vásquez-Cortez[3], Jhoan Alfredo Plua-Montiel*[4,5], Matteo Radice[6]

[1] Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias de la Industria y Producción. Carrera de Agroindustria. Campus Finca Experimental "La María". CP. 121250. Km. 7 ½ vía El Empalme, cantón Mocache, Los Ríos. Ecuador
[2] Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Pecuarias y Biológicas Laboratorio de Biología y Microbiología. Campus Finca Experimental "La María". CP. 121250. Km. 7 ½ vía El Empalme, cantón Mocache, Los Ríos. Ecuador.
[3] Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Agroindustria, Babahoyo, Los Ríos, Ecuador.
[4] Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Av. General Rumiñahui s/n Sangolquí, Ecuador, P.O.BOX: 171-5-231B.
[5] Instituto Superior Tecnológico Consulting Group Ecuador-Esculapio. Av. 10 de Agosto N35-108 e Ignacio San María.
[6] Campus Puyo, Universidad Estatal Amazónica, Km 2 1/2 Via Puyo-Tena, Puyo 160150, Ecuador.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the antimicrobial and antioxidant properties of polyphenols extracted from Macambo (*Theobroma bicolor*) seeds using two extraction methods: ultrasound and agitation. Two parts of the seed (shell and cotyledon) were used as sources for the extracts, and three hydroalcoholic solutions (1:3, 1:1, 3:1) were tested. The results showed that maceration by agitation with a 1:3 hydroalcoholic ratio was the most effective, achieving the highest extraction yields for both the shell (60.35 %) and the cotyledon (68.06 %). Additionally, both sources of the extract presented high polyphenol content and significant antioxidant activity, underscoring the potential of Macambo polyphenols as natural antioxidants. Specifically, high polyphenol content was observed in the shell (17.31 mg GAE/g) and cotyledon (10.40 mg GAE/g) extracts using maceration by agitation and ultrasound, respectively, at the 1:3 solvent ratio. The extracts exhibited notable antioxidant activity, particularly in the shell (23119.24 µmol TE/100 g) and the cotyledon (96943.78 µmol TE/100 g) under ultrasound extraction with the same solvent ratio. The antimicrobial activity, evaluated against *Salmonella* and *E. coli*, showed inhibition values of up to 88.97 %, making these extracts a promising option for the development of preservatives or antimicrobial treatments and offering an alternative for the sustainable use of natural resources.

Keywords: Theobroma bicolor, polyphenols, antioxidant activity, antimicrobial activity.

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los polifenoles extraídos de la semilla de macambo (*Theobroma bicolor*), mediante dos métodos de extracción: ultrasonido y agitación, aplicando dos fuentes para el extracto: Semillas, cáscara y cotiledón, bajo tres soluciones hidroalcohólicas (1:3, 1:1, 3:1). Se encontró que el tratamiento de maceración por agitación con una proporción hidroalcohólica de 1:3 fue el más efectivo, logrando mayores rendimientos de extracción tanto de la cáscara (60,35 %) como del cotiledón (68,06 %). Además, se presentó un alto contenido de polifenoles y una significativa actividad antioxidante para ambas fuentes de extracto, destacando el potencial de los polifenoles de Macambo como antioxidantes naturales. Se observó alto contenido de polifenoles en los extractos de cáscara (17,31 mg EAG/g) y cotiledón (10,40 mg EAG/g) bajo maceración por agitación y ultrasonido, respectivamente, en relación hidroalcohólica 1:3. los extractos mostraron una significativa actividad antioxidante, especialmente en cáscara (23119,24 µmol ET/100 g) y cotiledón (96943,78 µmol ET/100 g) por ultrasonido en la misma relación solvente. La actividad antimicrobiana evaluada contra *Salmonella enterica* y *E. coli* demostró valores de inhibición de hasta 88,97 %, resultando útil para el desarrollo de conservantes o tratamientos antimicrobianos y una alternativa para el aprovechamiento de recursos naturales.

Palabras clave: *Theobroma bicolor*, polifenoles, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la búsqueda de alternativas naturales para el tratamiento y prevención de enfermedades microbianas (Stan *et al*., 2021) y el estrés oxidativo ha cobrado un interés significativo dentro de la comunidad científica y la industria alimentaria (Cervantes-Valencia *et al*., 2024), por lo que se han realizado estudios en donde los compuestos poli fenólicos, presentes en diversas fuentes vegetales, han demostrado poseer potentes propiedades antioxidantes y antimicrobianas, convirtiéndolos en candidatos ideales para su aplicación en el desarrollo de nuevos productos naturales (Cruz *et al*., 2022). Entre las diversas fuentes de polifenoles,

*Autor para correspondencia: Jhoan Alfredo Plua-Montiel
Correo-e: japlua@espe.edu.ec
Recibido: 30 de mayo del 2025
Accepted: 1 de agosto del 2025
Publicado: 23 de agosto del 2025

DOI: 10.18633/biotecnia.v27.2672

las semillas de Macambo (*Theobroma bicolor*) representan un recurso poco explotado pero prometedor debido al potencial valor nutricional y medicinal de su fruto ya que se ha utilizado tradicionalmente como alimento y medicina por las comunidades indígenas (Salazar *et al*., 2021); sin embargo, el aprovechamiento de estos compuestos requiere de métodos de extracción eficientes que permitan obtener extractos de alta calidad sin comprometer sus propiedades. La importancia de desarrollar y optimizar técnicas de extracción radica en la necesidad de maximizar el rendimiento de compuestos bioactivos, preservando su actividad antioxidante y antimicrobiana (Haido *et al*., 2024); es así como la extracción por ultrasonido y la maceración por agitación se han presentado como alternativas viables, ofreciendo resultados prometedores en la obtención de extractos vegetales ricos en polifenoles (Peng *et al*., 2023). A pesar de los avances en el campo, existe una limitada investigación sobre la eficacia de estos métodos aplicados a la semilla de Macambo, lo que subraya la necesidad de explorar su potencial y contribuir un mayor conocimiento.

Con base en lo expuesto, se formuló la hipótesis de que la aplicación de las técnicas de extracción descritas afecta de manera significativa tanto el rendimiento de los extractos obtenidos como su actividad biológica, Derivado de lo anterior se planteó el siguiente objetivo, evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de polifenoles extraídos de la semilla de Macambo mediante los métodos de extracción de ultrasonido y maceración por agitación, efectuándose así la evaluación comparativa de ambos métodos, la determinación de las actividades biológicas previamente señaladas de los extractos, y la identificación de las condiciones óptimas para la extracción de polifenoles.

De esta forma se justifica la investigación en la necesidad de determinar el efecto de las técnicas de extracción de polifenoles a partir de las semillas de Theobroma bicolor, considerando el potencial de estos compuestos en la capacidad de mejorar la calidad, seguridad y valor nutricional de los productos alimenticios al actuar como antioxidantes y contrarrestar el crecimiento bacterias patógenas como Escherichia coli y Salmonella entérica, responsables de gastroenteritis y otras infecciones entéricas en la población general, con especial impacto en grupos vulnerables como niños, ancianos y personas inmunodeprimidas., así como proporcionar propiedades sensoriales mejoradas y reemplazar aditivos sintéticos en alimentos procesados; además, se responde a la creciente demanda de investigaciones centradas en la identificación y aprovechamiento de recursos naturales sostenibles, que no solo contribuyan a la salud humana sino también al desarrollo de la industria alimentaria y farmacéutica de forma sustentable.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología y Microbiología de la Finca Experimental "La María" perteneciente al campus de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo y localizada en el Recinto San Felipe a 7 ½ km en la ruta Quevedo – El Empalme, dentro de la jurisdicción del Cantón Mocache, Provincia de Los Ríos, Ecuador.

Muestreo y preparación de las muestras

Durante la temporada de cosecha (verano) del año 2025, se recolectaron mazorcas de macambo con un índice de madurez comercial en plantaciones de Theobroma bicolor situadas en la finca "El Remanso", en el cantón Buena Fe, provincia de Los Ríos, de las cuales se extrajeron los granos y se retiró la mayor cantidad posible de mucílago. Se colocaron las semillas en bolsas de polipropileno para fermentar durante 48 horas a una temperatura entre 30 °C y 35 °C. y minimizar la posterior acción oxidativa.

Cumplido el tiempo de fermentación, los granos fueron secados en una estufa de aire forzado por un tiempo de 48 h a 60 ºC, posterior a ello se descascarilló de forma manual cada una de las semillas, se molieron a fin de mejorar la superficie de contacto al momento de realizar la extracción y almacenaron a temperatura de congelación (-18 ºC) preservando la ausencia de luz y oxígeno que permita reducir la oxidación de compuestos fenólicos.

La extracción de compuestos bioactivos se realizó según las técnicas de obtención de extractos vegetales descritas por Cacique *et al*. (2020) y Kumar *et al*. (2021), con ciertas modificaciones. Se empleó una maceración en relación sólido/líquido de 1:10, en base a esto, se prepararon tres soluciones de 100 mL con diferentes concentraciones hidroalcohólicas (1:3, 1:1 y 3:1) y se adicionó en un matraz que contenía 10 g de la muestra de semillas molidas previamente pesadas, los matraces se taparon para evitar la oxidación del compuesto bioactivo durante el proceso y pasó a colocarse en el equipo respectivo al método de extracción sugerido en cada tratamiento. En el caso de la extracción por maceración con agitador, se colocó los matraces en un agitador vaivén con velocidad de 200 rpm y temperatura de 21 - 23 ºC durante 24 h; en la extracción asistida por ultrasonido, se colocaron los matraces en una tina ultrasónica con agua destilada con una temperatura del baño de 28 - 30 ºC, a una frecuencia de 40 kHz y durante 90 min. Posteriormente, se filtró el macerado y se sometió a un proceso de centrifugación a 4000 rpm durante 5 min, el sobrenadante obtenido se destiló mediante un rotavapor a 128 rpm con temperatura del baño de 50 ºC durante 1 h, hasta que se evaporó del macerado el solvente orgánico utilizado. A la solución obtenida del rotavapor se le realizó nuevamente una centrifugación con los parámetros antes mencionados y se filtró al vacío, obteniéndose la muestra para el análisis de actividad antioxidante y antimicrobiana.

Actividad antioxidante

Se cuantificaron los polifenoles presentes en los extractos mediante espectrofotometría UV-Visible, utilizando un espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific GENESYS 10S UV-Vis. Inicialmente, se identificó la longitud de onda correspondiente al pico máximo de absorbancia, asegurando una adecuada difusión de los compuestos, y posteriormente se siguió la metodología descrita por Dominguez *et al*. (2023).

Para tomar el volumen exacto de las soluciones se empleó una micropipeta con set de puntas desechables que facilitó la toma de las muestras y adición a celdas de cuarzo limpias, con ello se accionó el equipo que generó los datos requeridos y se anotó los valores de absorbancia y longitud de onda para el cálculo de mg EAG/g.

La capacidad antioxidante se determinó a los tratamientos que presentaron mejor contenido de polifenoles, para esto se siguió el método de decoloración del catión radical ABTS+ propuesto por Dong *et al.* (2015), con breves adaptaciones, en donde se preparó una fuente de radicales empleando disolución de persulfato de potasio (2.45 mM) y disolución de ABTS+ (7 mM) en una relación 1:1 y se dejó reposar por 16 horas a temperatura ambiente y oscuridad. A partir de la fuente de radicales se preparó una disolución de trabajo en una proporción 1:25 con una disolución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 (75 mmol• L-1 fosfato de sodio monobásico 0.2 mol• L-1 y fosfato de sodio dibásico 0.02 mol •L-1), hasta obtener una lectura de absorbancia de 1.1 ± 0.01 a 734 nm. Para la determinación de la actividad antioxidante se transfirió en un tubo de vidrio un volumen de 200 µL de extracto bruto debidamente diluido con 3800 µL de la disolución de trabajo. Con ayuda de un agitador se homogenizó los tubos y se dejó reposar durante 45 min a temperatura ambiente y oscuridad. La cuantificación de la actividad antioxidante se realizó por espectrofotometría UV-VIS frente a una curva estándar de Trolox (0 - 800 µmol• L-1). Los resultados se expresan como µM TE• mL-1 de muestra.

Actividad antimicrobiana

Se efectuó un ensayo de sensibilidad por el método de Kirby-Bauer adaptado de (Furtado y Medeiros, 1980), determinando la existencia o ausencia de inhibición del extracto puro en las dos cepas de estudio, para ello, se preparó un medio de cultivo Agar papa dextrosa (PDA), tanto para *Escherichia coli* como para *Salmonella enterica*, y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 min. Se colocó en las cajas Petri 10 mL del medio de cultivo esterilizado y se dejó solidificar en la cámara de flujo laminar con el UV encendido durante 15 minutos; a su vez, se impregnó los papeles filtros redondos con el extracto puro en tubos Eppendorf y luego de solidificado el agar, se realizó la difusión en placa de la cepa bacteriana con un asa Drigalsky, mismas a las que se les colocó los sensidiscos respectivos y que posteriormente se sometieron a incubación por 24 horas a 35 °C. Tras finalizar el tiempo de incubación, se extrajeron las placas Petri del ambiente controlado y se procedió con la medición del diámetro en milímetros, con una regla, de cada halo de inhibición.

Una vez que se determinó la existencia de inhibición con el extracto en estudio, se realizó un ensayo turbidimétrico adaptado de la metodología de (Ramírez y Marín, 2009), para lo cual se preparó el medio líquido LB Miller y llevó a la autoclave a una temperatura de 121 ºC Durante 40 min. Completado esto, se procedió a realizar las diluciones del extracto en matraces Erlenmeyer adicionando en el mismo el medio líquido y el extracto de acuerdo con las concentraciones planteadas del estudio para 20 mL; adicionalmente, se preparó una muestra control (testigo) solo con medio líquido y se inoculó con la cepa bacteriana respectiva cada uno de los matraces, los cuales se cubrieron con papel de aluminio y colocaron en un agitador vaivén a 200 rpm. La capacidad inhibitoria se determinó a partir de la lectura de absorbancia a 650 nm según Naughton *et al*. (2001), en un espectrofotómetro cada 24 h por 4 d, estableciendo el crecimiento bacteriano para cada bacteria a distintas concentraciones del extracto.

El resultado se interpretó como porcentaje de inhibición:

$$\%\, I = \frac{ABS_c - ABS_t}{ABS_c} * 100$$

Dónde:
ABS_c: Absorbancia muestra control.
ABS_t: Absorbancia tratamiento.

Tratamientos de estudio

En la Tabla 1 se presentan los doce tratamientos experimentales aplicados, los cuales resultan de la combinación de:
Factor A: Dos métodos de extracción: agitación (maceración mecánica) y ultrasonido.
Factor B: Dos fracciones de semilla: cáscara y cotiledón.
Factor C: Tres relaciones hidroalcohólicas (v/v): 1:3, 1:1 y 3:1.
Cada tratamiento ha sido codificado como T1 a T12 para facilitar su identificación en el análisis de rendimientos, contenido de polifenoles y actividad antioxidante y antimicrobiana.

Diseño estadístico

Se utilizó el software STATGRAPHICS para el análisis estadístico por ANOVA, empleando la prueba de significancia de Tukey en un diseño factorial A x B x C, a fin de constatar que existió variación en el contenido de polifenoles según la fuente del extracto, el tipo de método de extracción y la relación hidroalcohólica aplicada. De igual manera se realizó un tratamiento de datos con diseño factorial A x B x C para determinar la actividad antimicrobiana del extracto en relación con las concentraciones aplicadas, tipo de bacterias en estudio y tiempo de lectura. Para ambos análisis, se identificó el tratamiento con mayor efectividad considerando un nivel de significancia de $p \leq 0,05$.

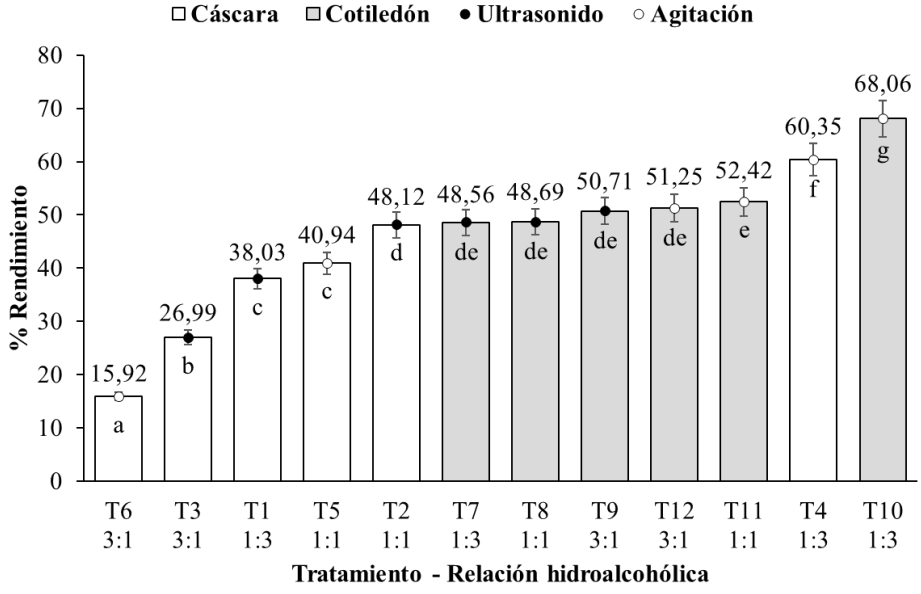
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Rendimiento de extractos vegetales

El cálculo del rendimiento de las muestras de semillas de macambo maceradas, de la cascara cáscara (episperma) y el cotiledón, presentaron diferencias significativas (Figura 1) siendo que al aplicar una extracción por agitación con relación hidroalcohólica 1:3 existe un mayor rendimiento para ambas partes de la semilla luego del filtrado (cáscara: 60.35 %, cotiledón: 68.06 %); además de ello, se logró visualizar que para todos los tratamientos, en función del método de extracción y la relación hidroalcohólica, el rendimiento del extracto es mayor en el cotiledón yendo desde 48.56 % a 68.06 %, en contraste de la cáscara que fue desde 15.92 %

Tabla1. Codificación de los tratamientos experimentales para la extracción de polifenoles de semillas de *macambo*.
Table 1. Coding of the experimental treatments for polyphenols extraction from *macambo* seeds.

Tratamiento	FACTOR A Método de extracción	FACTOR B Fracción de semilla	FACTOR C Relación hidroalcohólica (v/v)
T1	Agitación	Cáscara	1:3
T2	Agitación	Cáscara	1:1
T3	Agitación	Cáscara	3:1
T4	Agitación	Cotiledón	1:3
T5	Agitación	Cotiledón	1:1
T6	Agitación	Cotiledón	3:1
T7	Ultrasonido	Cáscara	1:3
T8	Ultrasonido	Cáscara	1:1
T9	Ultrasonido	Cáscara	3:1
T10	Ultrasonido	Cotiledón	1:3
T11	Ultrasonido	Cotiledón	1:1
T12	Ultrasonido	Cotiledón	3:1



Fuente: elaboración propia. Source: own elaboration

Figura 1. Efecto de los factores de estudio en el porcentaje de rendimiento del extracto macerado.
Figure 1. Effect of the study factors on the percentage yield of the macerated extract.

a 60.35 %. Esta diferencia del rendimiento es muy notoria cuando se compara ambas fuentes bajo una extracción en solución hidroalcohólica 3:1 ya sea por ultrasonido (T3, T9) o agitación (T6, T12), dando por el primer método 26.99 % en cáscara y 50.71 % en cotiledón, mientras que por el segundo método se obtuvo 15.92 % para cáscara y para el cotiledón 51.25 %.

La variación en los porcentajes de rendimiento para ambas fuentes de extracto bajo una relación hidroalcohólica 1:3, comprendida entre 38.03 y 68.06 % después de la maceración, contrasta notablemente con los hallazgos de Benítez *et al*. (2020), quienes informaron un rendimiento más bajo, situándose entre un 37-40 %; esta diferencia puede atribuirse a la influencia de la relación hidroalcohólica utilizada en el proceso y la fuente de extracción, ya que, en el presente estudio, la combinación de solventes en dicha relación demostró ser más eficiente. Cabe destacar también que la discordancia persiste al analizar los resultados específicos de la cáscara de la semilla; mientras que Benítez *et al*. (2020) indican rendimientos de 40 % para una relación hidroalcohólica 3:1, en este estudio se reveló valores más bajos, entre 15.92 y 26.99 %, fenómeno que ocurre ya que esta fuente del extracto presenta componentes como proteínas, polisacáridos y polifenoles que al interactuar entre sí durante el proceso de extracción, genera un efecto en las propiedades de gelificación, como lo menciona Ma y Chen (2023); además, el uso de una relación con alta proporción de agua, de acuerdo con Tannir *et al*. (2024), también afecta a la solubilización de

compuestos fenólicos ya que se extraen otros compuestos no deseados que contribuyen a la formación de geles.

Determinación del contenido de polifenoles totales

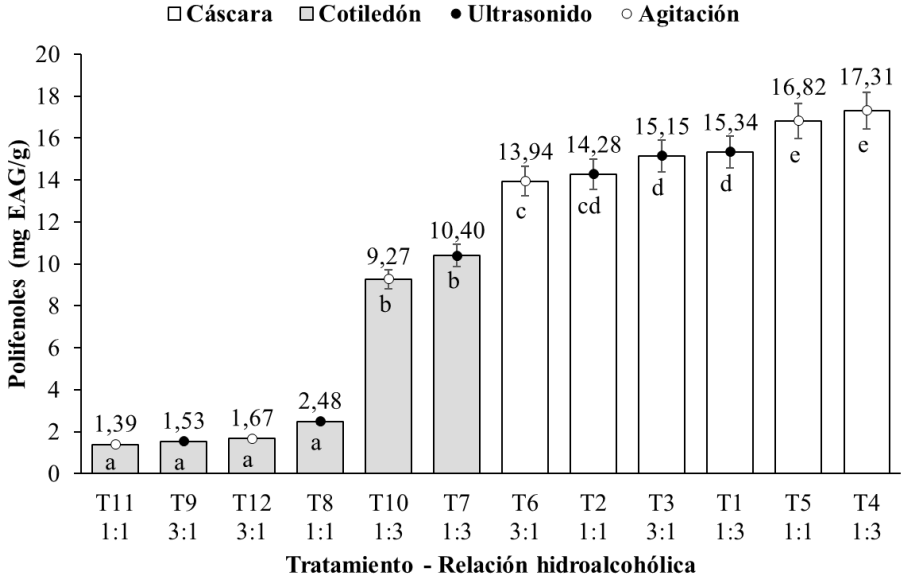
Existió diferencia significativa en la interacción de los tres factores de estudio (fuente del extracto, método de extracción y relación hidroalcohólica), demostrando que el compuesto bioactivo del extracto vegetal de las semillas de *macambo* presentó un mayor contenido de polifenoles en el grupo homogéneo "e" (Figura 2) correspondiente al tratamiento 4 (Cáscara + maceración por agitación + relación hidroalcohólica 1:3) y el tratamiento 5 (Cáscara + maceración por agitación + relación hidroalcohólica 1:1), con 17,31 y 16.82 mg EAG/g respectivamente; a diferencia del grupo "a" comprendido entre los tratamientos 11 (Cotiledón + maceración por agitación + relación hidroalcohólica 1:1), 9 (Cotiledón + maceración por ultrasonido + relación hidroalcohólica 3:1), 12 (Cotiledón + maceración por agitación + relación hidroalcohólica 3:1) y 8 (Cotiledón + maceración por ultrasonido + relación hidroalcohólica 1:1), los cuales reflejaron el menor contenido polifenólico siendo este de 1.39, 1.53, 1.67 y 2.48 mg EAG/g respectivamente.

El contraste en los resultados antes establecidos puede deberse a razones como que la composición química de la cáscara frente al cotiledón es considerablemente diferente, ya que los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que suelen estar asociados con la defensa de la plantas contra herbívoros, patógenos y radiación UV, por lo que en las cáscaras de semillas su concentración suele ser mayor, como lo explica Lim *et al*. (2021); a diferencia del cotiledón que al ser una estructura embrionaria que almacena nutrientes esenciales para el crecimiento de la planta, puede tener una menor concentración de dichos compuestos (Attree *et al*., 2015). Además de lo anterior, la eficacia de la extracción de compuestos fenólicos puede variar significativamente con la técnica de extracción utilizada, incluida la relación hidroalcohólica, por lo que las relaciones hidroalcohólicas más concentradas, como 1:3 y 1:1, pueden extraer una mayor cantidad de compuestos fenólicos de la cáscara, lo que es consistente con los hallazgos de Xia *et al*. (2024), quienes demostraron que solventes con mayor polaridad pueden extraer más eficientemente estos compuestos, lo que podría explicar los altos niveles de polifenoles en los tratamientos 4 y 5.

Las discrepancias observadas también se atribuyen a la variabilidad inherente de las muestras vegetales y a las diferencias en la eficiencia de la maceración por agitación, ya que, como lo mencionan Andishmand *et al*. (2023), la agitación constante facilita la disolución y el transporte de los metabolitos desde la matriz vegetal hacia el solvente, resultando en mayor efectividad, sin embargo, esto también varía según el tipo de material vegetal y las condiciones específicas de extracción.

Determinación de la actividad antioxidante

Se eligió a los mejores tratamientos en función de la relación hidroalcohólica que dio el mayor contenido de polifenoles y de mayor frecuencia (1:3), permitiendo la comparación entre las dos fuentes de extracto y los dos métodos de extracción en estudio: T10 (Cotiledón + Agitación + 1:3), T7 (Cotiledón + Ultrasonido + 1:3), T1 (Cáscara + Ultrasonido + 1:3) y T4 (Cáscara + Agitación + 1:3).



Fuente: elaboración propia. Source: own elaboration

Figura 2. Contenido de polifenoles bajo la prueba de Tukey HSD (P<0,05) considerando la interacción de los Factores A*B*C.

Figure 2. Polyphenol content under the Tukey HSD test (P<0.05) considering the interaction of Factors A*B*C.

Los resultados del ANOVA demostraron que existió diferencia significativa entre los factores de estudio (fuente del extracto y método de extracción) (*Tabla* 1), indicando que el extracto del T7 conformado por la muestra del cotiledón sometido a ultrasonido con una relación hidroalcohólica de 1:3 mostró la mayor capacidad antioxidante siendo esta de 96943.78 µmol ET/100 g, seguido del tratamiento 10 (cotiledón + agitación + 1:3) con 75916.81 µmol ET/100 g. Por el contrario, los extractos obtenidos de la cáscara, ya sea por agitación (T4) o ultrasonido (T1), presentaron las capacidades antioxidantes más bajas, siendo estas de 15680.61 y 23119.24 µmol ET/100 g respectivamente; además, entre los métodos de extracción se presencia que existió diferencia significativa, misma que se denota en la variable respuesta ya que tanto la cáscara como el cotiledón bajo una extracción por agitación (T4, T10) presentan cantidades inferiores a las obtenidas cuando dichas fuentes del extracto se someten a una extracción por ultrasonido (T1, T7).

Conforme a lo anterior, Tafurt *et al*. (2021), determinó en el extracto vegetal de granos de cacao sin fermentar una capacidad antioxidante de 198000 µmol ET/100 g muestra, siendo este valor superior en un 51.03 % al compararlo con el mejor tratamiento del extracto vegetal de las semillas de macambo en este estudio (96943.78 µmol ET/100 g); sin embargo, dicho valor es relativamente alto en comparación con los datos proporcionados por otras investigaciones como las de Yu *et al*. (2021) y Hernández *et al*. (2024) cuyos extractos de menta, romero, ruda y residuos de cacao, poseen una capacidad antioxidante inferior a 42000 µmol ET/100 g; con ello se sugiere que la superioridad del extracto con el tratamiento 7 puede atribuirse a la efectividad del ultrasonido para liberar dichos compuestos del material vegetal, de acuerdo con lo reportado en estudios previos de Teffane *et al*. (2021), en donde menciona que el ultrasonido mejora la extracción debido al efecto de la cavitación que al generar fuerzas de cizallamiento y turbulencia puede romper las paredes celulares y facilitar la liberación de compuestos como enzimas antioxidantes o antioxidantes nutricionales; al contrario del método convencional por agitación que resulta menos eficiente en la extracción de compuestos antioxidantes debido a que su fuerza impulsora se basa en la difusión de estos compuestos hacia el solvente por el contacto del material vegetal con este y por ende no se genera la ruptura de las paredes celulares como en el caso del otro método de estudio.

El criterio antes mencionado no atribuye a que el contenido polifenólico actúe de forma similar al resultado de la capacidad antioxidante ya que en el caso de este estudio, la cantidad de polifenoles para ambos métodos de extracción resultó similar, no existió diferencia significativa (Factor B: p-valor = 0,1440 > 0,05), estableciendo que ambos métodos resultan suficientemente eficaces para liberar polifenoles, aspecto que no ocurre en la liberación de los antioxidantes ya que la presencia del fenómeno de cavitación y ruptura de paredes celulares sí tiene influencia, y por ende, el contenido de polifenoles no siempre se correlaciona directamente con la capacidad antioxidante, debido a que otros factores como la estructura y la actividad de las moléculas también pueden influir en la capacidad antioxidante de la muestra, como lo mencionan Burnaz (2021) y Heckmann *et al*. (2024).

Al realizar la comparación entre el contenido polifenólico y la capacidad antioxidante atribuida a los tratamientos 7 y 4, se logró visualizar que aunque T7 presentó la capacidad antioxidante más alta (96943.78 µmol ET/100 g) y T4 la más baja (15680.61 µmol ET/100 g), el contenido polifenólico fue viceversa, T7 presentó el menor contenido de polifenoles (10.4 mg EAG/g) mientras que T4 fue el mayor (17.31 mg EAG/g); esto se atribuye a que, independientemente del método de extracción y la relación hidroalcohólica aplicada, el materia vegetal empleado en T4 fue la cáscara mientras que en T7 fue el cotiledón. Conforme a lo anterior, se fundamentó en base a la investigación de Islam y Dhaubhadel (2023), Keivani *et al*. (2024) y Galgano *et al*. (2021), que la menor capacidad antioxidante atribuida a la cáscara puede deberse a la presencia de polifenoles específicos como las procianidinas, las cuales tienen una actividad antioxidante más baja en comparación con otros polifenoles, además, la cáscara contiene mayores cantidades de taninos que contribuyen a un mayor contenido de polifenoles, sin embargo, estos tienden a tener una capacidad antioxidante más limitada debido a su estructura molecular y a su interacción con otros compuestos antioxidantes como flavonoides, vitaminas y minerales, los cuales reducen su actividad general al actuar como agentes reductores o formar complejos con iones metálicos que los taninos necesitan para ejercer su actividad antioxidante.

Por otra parte, en relación a lo anterior y el estudio de (Lim *et al*., 2021), el cotiledón puede tener un menor contenido total de polifenoles pero una mayor capacidad antioxidante atribuida a la presencia de polifenoles específicos como flavanoles y flavonoles, ya que estos son conocidos por sus fuertes propiedades antioxidantes que les permiten neutralizar los radicales y proteger las células del daño oxidativo de manera más efectiva; además, esta fuente también contiene otros compuestos antioxidantes como vitaminas y minerales que podrían contribuir a su mayor capacidad antioxidante general.

Determinación de la actividad antimicrobiana

1. Ensayo de sensibilidad o antibiograma

Se investigó la actividad antimicrobiana del extracto de cáscara de macambo contra dos especies bacterianas de patógenos por 72 h, en donde el mayor halo de inhibición registrado fue contra *Salmonella* (> 10 mm) hasta las 48 h de lectura, por el contrario, frente a *Escherichia coli* el extracto presentó una actividad mediana (8 - 10 mm) desde las 24 h de lectura (*Tabla* 2).

El comportamiento antes planteado puede atribuirse a causas biológicas y fisicoquímicas como las diferencias en la composición de la pared celular entre gram-positivas y gram-negativas, las cuales podrían influir en la permeabilidad del extracto, siendo así que, de acuerdo con lo descrito por Tavares *et al*. 2020 en su estudio referente a la actividad de biomoléculas especializadas contra bacterias Gram positivas

Tabla 2. Resultados del análisis de comparación de la capacidad antioxidante de los extractos seleccionados.
Table 2. Comparison analysis results of the antioxidant capacity of the selected extracts.

Extracto seleccionado	Capacidad antioxidante (µmol ET/100 g)
T4: Cáscara + Agitación + 1:3	15680,61[A]
T1: Cáscara + Ultrasonido + 1:3	23119,24[B]
T10: Cotiledón + Agitación + 1:3	75916,81[C]
T7: Cotiledón + Ultrasonido + 1:3	96943,78[D]

Fuente: elaboración propia. Source: own elaboration

y Gram negativas, las cepas de *Salmonella* (gram-negativas) tienen una membrana externa más permeable que puede ser más susceptible a los compuestos bioactivos del extracto en comparación con *Escherichia coli* (también gram-negativa), los cuales poseen mecanismos de resistencia más efectivos; además de ello, las diferencias en la composición lipídica de las membranas externas pueden afectar la susceptibilidad a antimicrobianos.

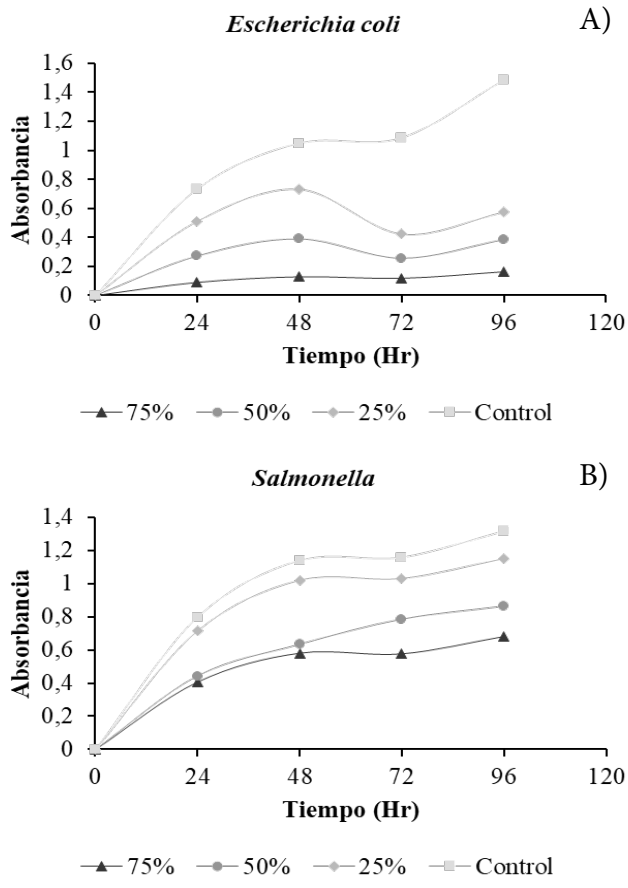
2. Ensayo turbidimétrico

Curvas de crecimiento microbiano

Las curvas de crecimiento para las concentraciones del extracto frente a las cepas de *Salmonella* y *Escherichia coli* reflejan diferentes perfiles de crecimiento y sensibilidad (Figura 3); así, para la muestra control, la curva en *Salmonella* (A) evidencia que la fase de crecimiento exponencial se extiende hasta las 48 h, punto tras el cual la curva comienza a mostrar un ascenso menos pronunciado, lo que sugiere el inicio de la siguiente fase; por el contrario, en la curva de *E. coli* (B) se muestra un patrón diferente, ya que la absorbancia en la control continúa en ascenso incluso luego de las 96 h de análisis, lo que indica que la primera fase de crecimiento es más prolongada o que la entrada a la fase estacionaria es más tardía en comparación con la otra cepa en estudio.

En el caso de las concentraciones, para *Salmonella*, la concentración del 75 % muestra una tendencia general de aumento de la absorbancia con el tiempo, con una disminución leve entre las 48-72 h antes de aumentar nuevamente entre las 72 y 96 h, indicando que las bacterias son capaces de crecer sustancialmente en presencia del extracto al principio, pero el crecimiento se ralentiza ligeramente antes de reanudarse en un momento posterior; por otra parte, la concentración al 50 % refleja un aumento constante de la absorbancia con el tiempo, presentando una fase de crecimiento más larga; mientras que al 25 % demuestra una curva similar a la control pero con valores de absorbancia menores, incurriendo en la no afectación a las fases de crecimiento pero sí a la carga bacteriana ya que esta fue inferior a la testigo.

Para *Escherichia coli*, la aplicación del extracto refleja una mayor influencia en las fases de crecimiento y carga bacteriana de esta cepa, ya que los valores de absorbancia fueron menores a los de *Salmonella* en todas las concentraciones. En consecuencia, podemos visualizar en la figura B que esta bacteria a una concentración del 75 % muestra una tendencia similar a *Salmonella* con un aumento inicial de la absorbancia seguido de una disminución leve y una reanudación del crecimiento; sin embargo, las concentraciones del 50 y 25 % muestran un patrón diferente, con una disminución de la absorbancia en las 48-72 h y un aumento en las 72 - 96 h.



Fuente: elaboración propia. **Source:** own elaboration

Figura 3. Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas de ensayo frente a las variaciones de concentración del extracto. *Salmonella* (A), *Escherichia coli* (B).
Figure 3. Growth curves of the test bacterial strains against variations in extract concentration. *Salmonella (A), Escherichia coli (B).*

De manera general se ha visualizado que el crecimiento de las bacterias en estudio ha disminuido conforme a la concentración de extracto vegetal aplicado, implicando que esta variabilidad en la fase de crecimiento exponencial y la entrada a la fase estacionaria entre ambas cepas resulte de las diferencias en la fisiología y la genética de estas, comportamiento que se menciona en estudios como los de Baran *et al*. (2023), quienes han planteado que las variaciones en la composición de la pared celular y mecanismos de resistencia intrínsecos pueden influir significativamente en la sensibilidad a compuestos antimicrobianos.

Porcentaje de inhibición

Se encontró diferencia significativa entre los factores de estudio de las concentraciones aplicadas del extracto, tipo de bacterias evaluada y tiempo de lectura, indicando una relación directa entre la cantidad de extracto y la capacidad de inhibir el crecimiento en las dos cepas de estudio (Figura 4).

Tabla 3. Zonas de inhibición (mm) mostradas por el extracto de cáscara de macambo frente a las cepas utilizadas.
Table 3. Inhibition zones (mm) shown by macambo peel extract against the strains used.

Bacterias	Inhibición		
	24 h	48 h	72 h
Salmonella	++	++	+
Escherichia coli	+	+	+

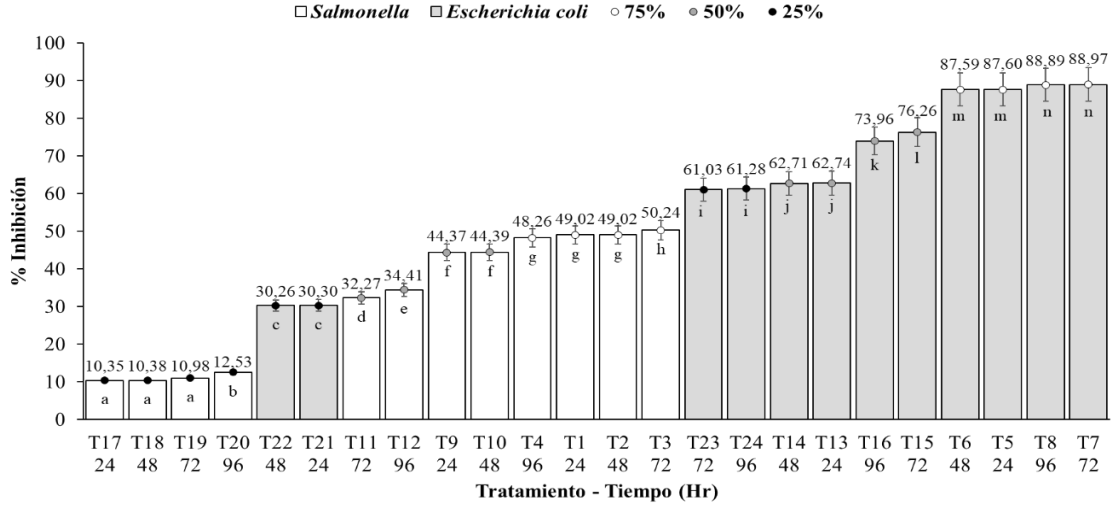
Fuente: elaboración propia. Source: own elaboration

Nota. Actividad de acuerdo con el diámetro de la zona de inhibición: (-) < 5 mm débil; (+) 5-10 mm mediana; (++) 10-20 mm fuerte; (+++) > 20 mm muy fuerte. Especificaciones adoptadas de (Sanam *et al*., 2022).

En el caso de *E. coli*, se presenció que la inhibición es más pronunciada que frente a *Salmonella* para todas las concentraciones, siendo particularmente notable a la mayor concentración (75 %) ya que alcanzó valores de 88.89 - 88.97 % de inhibición a las 96 y 72 h de ensayo, en comparación de la otra cepa que fue de 50.24 % en su mayor apogeo a las 72 h de lectura. Por otra parte, se observa una disminución marcada de esta variable para *Salmonella* en la concentración de 25 %, denotando durante los 4 d de lectura valores de 10.35 a 12.53 %, en contraste de *Escherichia coli* que a dicha concentración presentó valores de 30.26 % a las 48 h de lectura, hasta 61.28 % de inhibición a las 96 h. Dicho resultado implica que la resistencia de *Salmonella* es mayor a concentraciones bajas, sugiriendo la tenencia de mecanismos de defensa más fuerte frente a las propiedades antimicrobianas del extracto o que el extracto pierde eficacia a concentraciones menores; mientras que para *E. coli* resulta efectiva tanto a bajas como altas concentraciones, siendo en este último la mejor.

Conforme a los resultados antes mencionados, se determinó que *E. coli* resulta más susceptible que *Salmonella* debido a factores como su fisiología y afectación ante la presencia de los compuestos bioactivos del extracto, ya que, basados en los estudios de Soni *et al*. (2024), Alodaini *et al*. (2024), y Punchihewage *et al*. (2024), en cuanto a su fisiología y genética, *E. coli* puede mostrarse más susceptible debido a que posee una capa de peptidoglicano más delgada en su pared celular y expresa niveles más altos de porinas de membrana externa que facilita la entrada de agentes antimicrobianos en la célula bacteriana; por el contrario, *Salmonella* tiene una membrana externa más resistente y compacta que actúa como una barrera más efectiva frente a compuestos extraños, además de poseer mecanismos de resistencia a estos agentes como bombas de eflujo que expulsan sustancias tóxicas de la célula o modificaciones estructurales que impiden la unión de los compuestos antimicrobianos.

Sumado a lo anterior, los compuestos activos presentes en el extracto de cáscara de *Theobroma bicolor*, pueden influenciar de igual manera ya que basados en investigaciones previas como la de Reddy *et al*. (2008), se ha demostrado que la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos vegetales contribuyen a su capacidad antimicrobiana, y estos compuestos fenólicos presentes en el extracto resultan más efectivos contra *E. coli* debido a su capacidad para dañar la membrana celular y alterar funciones vitales, además de que la presencia de ácidos orgánicos puede crear un ambiente ácido que es desfavorable para su crecimiento, acción que se fundamenta con el estudio de Takó *et al*. (2020), quienes indicaron que los extractos ricos en polifenoles pueden penetrar la membrana externa de *E. coli*, interfiriendo con la síntesis de proteínas y el ADN bacteriano; adicional a ello, la resistencia observada en *Salmonella* incluso a altas concentraciones, de acuerdo con la investigación de Spector y Kenyon, 2012, puede ser el resultado de mecanismos



Fuente: elaboración propia. Source: own elaboration

Figura 4. Porcentaje de inhibición frente a *Salmonella* y *E. coli* a partir de tres concentraciones del extracto vegetal y distintas horas de análisis.
Figure 4. Percentage of inhibition against *Salmonella* and *E. coli* from three concentrations of the plant extract and different hours of analysis.

adaptativos como la alteración de sus vías metabólicas y la formación de biopelículas que reducen la eficacia de los compuestos activos que actúan como antimicrobianos en el extracto.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron los extractos de la cáscara y el cotiledón de la semilla de *Theobroma bicolor* mediante ultrasonido y maceración con agitación, siendo el método de extracción por maceración con agitación y relación hidroalcohólica 1:3 el más eficaz, obteniendo los mayores rendimientos tanto en cáscara (60.35 %) como en cotiledón (68.06 %) de la semilla de *Theobroma bicolor*. La selección cuidadosa del método y la proporción de solvente son cruciales para maximizar la eficiencia de extracción de compuestos bioactivos. Con respecto a la actividad antioxidante el extracto de cotiledón por ultrasonido mostró la mayor capacidad antioxidante (96943.78 µmol ET/100g) y contenido de polifenoles (10,40 mg EAG/g), aunque no hubo relación directa entre estos dos factores, el contenido polifenólico varió entre cáscara y cotiledón, la capacidad antioxidante fue más alta en el cotiledón.

Los extractos de semillas de *Theobroma bicolor* demostraron actividad antimicrobiana contra *Salmonella* y *E. coli*, siendo más efectivos contra *E. coli* (88.89 % de inhibición al 75 % de extracto) que contra *Salmonella* (48.26 % de inhibición al 75 %). Los resultados resaltan el potencial de los extractos de *Theobroma bicolor* como antioxidantes y agentes antimicrobianos naturales, con aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica.

AGRADECIMIENTOS

Se expresa un sincero agradecimiento a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por el respaldo académico brindado durante el desarrollo de este proyecto. Asimismo, se reconoce el apoyo y las facilidades proporcionadas por los laboratorios de Microbiología y Bromatología de dicha institución, cuya infraestructura y recursos fueron fundamentales para la realización de esta investigación.

CONFLICTS OF INTEREST

Los autores declaran no tener ningún tipo de conflicto de interés.

REFERENCES

Alodaini, D., Hernandez-Rocamora, V., Boelter, G., Ma, X., Alao, M.B., Doherty, H.M., Bryant, J.A., Moynihan, P., Moradigaravand, D., Glinkowska, M., Vollmer, W. y Banzhaf, M. 2024. Reduced peptidoglycan synthesis capacity impairs growth of *E. coli* at high salt concentration. *MBio*, *15*(4), 1. https://doi.org/10.1128/mbio.00325-24

Andishmand, H., Masoumi, B., Torbati, M., Homayouni-Rad, A., Azadmard-Damirchi, S. y Hamishehkar, H. 2023. Ultrasonication/dynamic maceration-assisted extraction method as a novel combined approach for recovery of phenolic compounds from pomegranate peel. *Food Science and Nutrition*, *11*(11), 7160-7171. https://doi.org/10.1002/fsn3.3642

Attree, R., Du, B. y Xu, B. 2015. Distribution of phenolic compounds in seed coat and cotyledon, and their contribution to antioxidant capacities of red and black seed coat peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Industrial Crops and Products*, *67*, 448-456. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.080

Baran, A., Kwiatkowska, A. y Potocki, L. 2023. Antibiotics and bacterial resistance—A short story of an endless arms race. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(6), 5777-5810. https://doi.org/10.3390/ijms24065777

Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R.A., Gallo-Corredor, J.A., Pérez Pacheco, N.O., Álvarez Sandoval, J.H., y Giraldo Aristizabal, C.I. 2020. Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, *15*(1), 31-40. https://doi.org/10.18359/rfcb.3597

Burnaz, N.A. 2021. Evaluation of ultrasonication and agitation extraction methods at different conditions on the phenolic composition and antioxidant activities of *mammillaria prolifera*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *83*(5), 963-973. https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.849

Cacique, A.P., Barbosa, É.S., de Pinho, G.P. y Silvério, F.O. 2020. Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *catharanthus roseus* (L.) g. don. *Ciencia e Agrotecnologia*, *44*. https://doi.org/10.1590/1413-7054202044017420

Cervantes-Valencia, M.E., López-Valdez, N., Rojas-Lemus, M., González-Villalva, A., Morales-Ricardes, G., Bizarro-Nevares, P., Ustarroz-Cano, M., Salgado-Hernández, J.Á., Mendoza-Martínez, S. y Lamas-Orozco, L.M. 2024. Natural antioxidants and their effect against oxidative stress caused by particulate matter pollution. *Revista de La Facultad de Medicina UNAM*, *67*(4), 7-20. https://doi.org/10.22201/fm.24484865e.2024.67.4.02

Cruz, J.E.R. da, Costa, J.L.G., Teixeira, T.A., Oliveira e Freitas, G.R., Gomes, M. de S. y Morais, E.R. 2022. Phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activity of extract from leaves and bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. *Revista Ciência Agronômica*, *53*. https://doi.org/10.5935/1806-6690.20220049

Dominguez-López, I., Pérez, M. y Lamuela-Raventós, R.M. 2023. Total (poly)phenol analysis by the Folin-Ciocalteu assay as an anti-inflammatory biomarker in biological samples. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *64*(27), 10048-10054. https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220031

Dong, J.W., Cai, L., Xing, Y., Yu, J. y Ding, Z.T. 2015. Re-evaluation of ABTS·G+ assay for total antioxidant capacity of natural products. *Natural Product Communications*, *10*(12), 2169-2172. https://doi.org/10.1177/1934578x1501001239

El Tannir, H., Houhou, D., Debs, E., Koubaa, M., Jammoul, A., Azakir, B., Khalil, M.I., El Darra, N. y Louka, N. 2024. Optimization of aqueous extraction of polyphenols from *Cuminum cyminum* seeds using response surface methodology and assessment of biological activity. *BioTech*, *13*(1), 1-14. https://doi.org/10.3390/biotech13010007

Furtado, G.L. y Medeiros, A.A. 1980. Single-disk diffusion testing (Kirby-Bauer) of susceptibility of *Proteus mirabilis* to chloramphenicol: Significance of the intermediate category. *Journal of Clinical Microbiology*, *12*(4), 550-553. https://doi.org/10.1128/jcm.12.4.550-553.1980

Galgano, F., Tolve, R., Scarpa, T., Caruso, M.C., Lucini, L., Senizza, B. y Condelli, N. 2021. Extraction kinetics of total polyphenols, flavonoids, and condensed tannins of lentil seed coat:

Comparison of solvent and extraction methods. *Foods*, *10*(8), 1810-1828. https://doi.org/10.3390/foods10081810

Haido, M.H., Matti, A.H. y Taher, S.M. 2024. Optimization of extraction conditions of bioactive compounds from kurdistan species urtica dioica. *Cureus*, *16*(5), e61146. https://doi.org/10.7759/cureus.61146

Heckmann, M., Stadlbauer, V., Drotarova, I., Gramatte, T., Feichtinger, M., Arnaut, V., Atzmüller, S., Schwarzinger, B., Röhrl, C., Blank-Landeshammer, B. y Weghuber, J. 2024. Identification of oxidative-stress-reducing plant extracts from a novel extract library—Comparative analysis of cell-free and cell-based in vitro assays to quantitate antioxidant activity. *Antioxidants*, *13*(3), 1-15. https://doi.org/10.3390/antiox13030297

Hernández-Domínguez, E., Espinosa-Solís, V., Hernández-Nava, R., García-Barrientos, R., Suarez Rodriguez, C., Gallardo-Bernal, P., Figueroa-Wences, V. y Sánchez-Mundo, M. 2024. Valorization of cocoa bean shell agro-industrial residues for producing functional hot water infusions. *Processes*, *12*(12), 1-17. https://doi.org/10.3390/pr12122905

Islam, N.S. y Dhaubhadel, S. 2023. Proanthocyanidin biosynthesis and postharvest seed coat darkening in pinto bean. *Phytochemistry Reviews*, *35*(1), 1-18. https://doi.org/10.1007/s11101-023-09895-8

Keivani, N., Piccolo, V., Marzocchi, A., Maisto, M., Tenore, G.C. y Summa, V. 2024. Optimization and validation of procyanidins extraction and phytochemical profiling of seven herbal matrices of nutraceutical interest. *Antioxidants*, *13*(5), 1-25. https://doi.org/10.3390/antiox13050586

Kumar, K., Srivastav, S. y Sharanagat, V.S. 2021. Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, *70*, 1. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105325

Lim, Y.J., Kwon, S.J., Qu, S., Kim, D.G. y Eom, S.H. 2021. Antioxidant contributors in seed, seed coat, and cotyledon of γ-ray-induced soybean mutant lines with different seed coat colors. *Antioxidants*, *10*(3), 1-16. https://doi.org/10.3390/antiox10030353

Ma, Y. y Chen, F. 2023. Plant protein heat-induced gels: Formation mechanisms and regulatory strategies. *Coatings*, *13*(11), 1-19. https://doi.org/10.3390/coatings13111899

Naughton, P.J., Mikkelsen, L.L. y Jensen, B.B. 2001. Effects of nondigestible oligosaccharides on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and nonpathogenic *Escherichia coli* in the pig small intestine in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(8), 3391-3395. https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3391-3395.2001

Peng, S., Zhu, M., Li, S., Ma, X. y Hu, F. 2023. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Chinese propolis. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, *7*, 1-15. https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1131959

Punchihewage-Don, A.J., Ranaweera, P.N. y Parveen, S. 2024. Defense mechanisms of *Salmonella* against antibiotics: a review. *Frontiers in Antibiotics*, *3*(1), 1-15. https://doi.org/10.3389/frabi.2024.1448796

Ramírez, L.S. y Marín Castaño, D. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, *15*(42), 263-268. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049

Reddy, B.S., Reddy, B.P., Raghavulu, S.V., Ramakrishna, S., Venkateswarlu, Y. y Diwan, P.V. 2008. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of *Soymida febrifuga* leaf extracts. *Phytotherapy Research*, *22*(7), 943-947. https://doi.org/10.1002/ptr.2433

Ruiz Salazar, R., Tinajero Carrizales, C., González Pérez, A.L., Rodríguez Castillejos, G.C., Castañón Nájera, G.. (2021). Comparación proximal en cacao (*Theobroma cacao*) y pataxte (*T. bicolor*) de tabasco y Chiapas, México. *POLIBOTÁNICA*, *26*(52), 135-149. https://doi.org/10.18387/polibotanica.52.10

Sanam, M.U.E., Detha, A.I.R. y Rohi, N.K. 2022. Detection of antibacterial activity of lactic acid bacteria, isolated from Sumba mare's milk, against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, *9*(1), 53-58. https://doi.org/10.5455/javar.2022.i568

Soni, J., Sinha, S. y Pandey, R. 2024. Understanding bacterial pathogenicity: a closer look at the journey of harmful microbes. *Frontiers in Microbiology*, *15*(1), 1-14. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1370818

Spector, M.P. y Kenyon, W.J. 2012. Resistance and survival strategies of *Salmonella enterica* to environmental stresses. *Food Research International*, *45*(2), 455-481. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.056

Stan, D., Enciu, A.M., Mateescu, A.L., Ion, A.C., Brezeanu, A.C., Stan, D. y Tanase, C. 2021. Natural compounds with antimicrobial and antiviral effect and nanocarriers used for their transportation. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.723233

Tafurt, G., Suarez, O., Lares, M. del C., Álvarez, C. y Liconte, N. 2021. Capacidad antioxidante de un chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar. *Revista Digital de Postgrado*, *10*(1), 1-8. https://doi.org/10.37910/RDP.2021.10.1.e280

Takó, M., Kerekes, E.B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J. y Vágvölgyi, C. 2020. Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against food-contaminating microorganisms. *Antioxidants*, *9*(2), 165-186. https://doi.org/10.3390/antiox9020165

Tavares, T., Antunes, J., Padrão, J., Ribeiro, A., Zille, A., Amorim, M.T., Ferreira, F. y Felgueiras, H. 2020. Activity of specialized biomolecules against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, *9*(6), 314-329. https://doi.org/10.3390/antibiotics9060314

Teffane, M., Boudries, H., Bey, M., Kadi, A. y Farid, B. 2021. Effect of solvent type, extraction temperature, agitation speed and microwave power on phenolic compound extraction and antioxidant activity of Apricot Kernels (*Prunus armeniaca* L.). *Current Bioactive Compounds*, *17*(1). https://doi.org/10.2174/1573407217666210215085507

Xia, B.-H., Yu, Z.-L., Lu, Y.-A., Liu, S.-J., Li, Y.-M., Xie, M.-X. y Lin, L.-M. 2024. Green and efficient extraction of phenolic components from plants with supramolecular solvents: Experimental and theoretical studies. *Molecules*, *29*(9), 1-19. https://doi.org/10.3390/molecules29092067

Yu, M., Gouvinhas, I., Rocha, J. y Barros, A.I.R.N.A. 2021. Phytochemical and antioxidant analysis of medicinal and food plants towards bioactive food and pharmaceutical resources. *Scientific Reports*, *11*(1), 1-14. https://doi.org/10.1038/s41598-021-89437-4