



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UN PRODUCTO ELABORADO A BASE DE
CHOCOLATE SUPLEMENTADO CON ACEITE DE SEMILLA DE
GRANADA COMO FUENTE NUTRACEÚTICA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

MÓNICA ALONSO DE JESÚS



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **MARÍA AMANDA GÁLVEZ MARISCAL**

VOCAL: Profesor: **BERTHA JULIETA SANDOVAL GUILLEN**

SECRETARIO: Profesor: **JOSÉ MOISÉS TALAMANTES GÓMEZ**

1er. SUPLENTE: Profesor: **RODOLFO FONSECA LARIOS**

2° SUPLENTE: Profesor: **BRENDA SÁNCHEZ SALAZAR**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM. DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN ANIMAL Y BIOQUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA: JOSÉ MOISÉS TALAMANTES GÓMEZ

SUSTENTANTE (S): MÓNICA ALONSO DE JESÚS



La Universidad de Guanajuato (División de Ciencias de la Vida) y
La Universidad Autónoma de Nuevo León (Facultad de Ciencias Biológicas)
otorgan la presente constancia a:

M. Alonso-de Jesús, J.M. Talamantes-Gómez y J.C. Ramírez-Orejel

Constancia No. **CNCYTA2019PTLPO019**

Por su destacada participación como ponente del trabajo libre:
***“Aislamiento e Identificación del Ácido Punícico como Compuesto
Bioactivo Presente en la Semilla de Granada (*Punica granatum*, L.) ”***
con clave AVS02 en la modalidad “Oral”, en el marco de actividades del:

**VI CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE INNOVACIÓN Y TENDENCIAS EN
PROCESAMIENTO DE**

XXI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE

ALIMENTOS

Llevado a cabo el 15, 16 y 17 mayo del 2019 en la División de Ciencias
Económico Administrativas del Campus Guanajuato en la ciudad de
Guanajuato, Gto. México

Ma. del Rosario Abraham Juárez

Dra. Ma. Del Rosario Abraham Juárez
Coordinadora del evento
Universidad de Guanajuato

Dr. Juan Gabriel Báez González

Dr. Juan Gabriel Báez González
Jefe del Departamento de Alimentos
Universidad Autónoma de Nuevo León

Constancia



2019
2019

ISSN: 2448-7503

INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



Publicación anual

Vol. 5

Publicado en Enero 2020

Aislamiento e identificación del ácido punícico como compuesto bioactivo presente en la semilla de granada (*Punica granatum*, L.)

M. Alonso-de Jesús^{1,2}, J.M. Talamantes-Gómez² y J.C. Ramírez-Orejuel²

1 Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. **2** Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Nutrición animal y Bioquímica. jose.talamantes@comunidad.unam.mx

RESUMEN: El aceite proveniente de la semilla (PSO, por sus siglas en inglés) de granada (*Punica granatum* L.), es rico en ácidos grasos insaturados, el más abundante es el ácido punícico (PUA, por sus siglas en inglés), un ácido graso trieno conjugado (omega-5), con diversos efectos benéficos a la salud. Se extrajo el aceite de la semilla por medio del método más eficiente (Soxhlet) con éter de petróleo, se identificó mediante cromatografía de capa fina (CCF) y se cuantificó los ácidos grasos presentes por cromatografía de gases (CG). El objetivo de este estudio fue encontrar el método más eficiente de extracción del ácido punícico así como, aislarlo, aportar mayor información sobre este ácido graso y observar sus propiedades benéficas en la salud. Los resultados por cromatografía de gases mostraron como ácido graso mayoritario al ácido docosadienoico. La CCF mostró diversas manchas y se obtuvo el valor de factor de retardo (Rf) del ácido punícico, se purificó y aisló para caracterizarlo con ayuda del espectro infrarrojo (FT-IR).

Palabras clave: Ácido punícico, bioactivo, PSO.

ABSTRACT: The oil from the pomegranate seed PSO, (*Punica granatum* L.), is rich in unsaturated fatty compounds, the most abundant is the punicic acid (PUA), a conjugated triene fatty acid (ω -5), with beneficial effects on health. The oil of the seed was extracted with the most efficient method (Soxhlet) with petroleum ether the present fatty acids were identified by Thin Layer Chromatography (TLC) and quantified, by Gas Chromatography (GC). The objective of this study was to find the most efficient method of extraction of punicic acid as well as to isolate it, provide more information about this fatty acid and observe its beneficial properties in health. The results by gas chromatography showed as docosadienoic acid as the major fatty acid. The CCF showed different spots and the delay factor value (Rf) of the punic acid was obtained, it was purified and isolated to characterize it with the help of the infrared spectrum (FT-IR).

Key words: Punicic acid, bioactive, PSO.

Área: Aprovechamiento y valorización de subproductos

INTRODUCCIÓN

La granada, *Punica granatum* L., pertenece a la familia *Punicaceae* y es una de las frutas comestibles más antiguas. Dentro de sus compuestos bioactivos y de mayor presencia en la semilla se encuentran los ácidos grasos insaturados con un 95%, siendo el más abundante el ácido punícico (PUA, por sus siglas en inglés), es un ácido graso trieno conjugado (omega-5).

El aceite de semilla de granada (PSO, por sus siglas en inglés) también contiene en cantidades menores otros isómeros de ácido linolénico conjugado (CLnA). También se ha encontrado que la acción sinérgica de los constituyentes de la granada suele ser superior a la de los constituyentes individuales (Lansky *et al.*, 2007; Vroegrijk *et al.*, 2011).

El PSO presenta diversas propiedades biológicas, como antioxidante, refuerzo en la función inmune y favorece el metabolismo de los lípidos, efecto en la inhibición del fotoenvejecimiento de la piel y lipoperoxidación (Goula & Adamopoulos, 2012). Entre otros efectos benéficos que se le ha atribuido la prevención y el tratamiento de diabetes, así como la hipertensión y la colesterolemia (Vroegrijk *et al.*, 2011; Banihani *et al.*, 2013).

Dichas enfermedades tienen un elevado riesgo en la salud; por lo que en el presente trabajo plantea el problema en tres fases; la fase inicial, que consistió en aislar, identificar y caracterizar de manera individual o conjunta el (los) compuesto(s) bioactivo(s) presente(s) en la semilla de la granada, con la finalidad de aportar mayor información sobre este ácido graso y reducir los problemas de síndrome metabólico.

Dentro del proyecto se plantearon los siguientes objetivos: Seleccionar el método de extracción más eficiente, para la obtención del ácido punícico en frutos con diversas etapas de maduración; así mismo, emplear diversas técnicas de extracción que no comprometan la estabilidad del ácido graso; determinar la presencia de dicho ácido por cromatografía de capa fina; cuantificar la cantidad presente del analito por cromatografía de gases y finalmente aislar el ácido punícico como compuesto bioactivo de la semilla de granada, para posteriormente observar sus propiedades benéficas en la salud.

El mejor rendimiento (10.85 %) en la extracción de los ácidos grasos se obtuvo con el disolvente éter de petróleo y por la técnica de Soxhlet, los ácidos grasos presentes se identificaron por cromatografía de capa fina resolviendo con un $R_f = 0.45$ para ácido punícico y 0.52 para linoléico; mediante cromatografía de gases de acuerdo a la técnica del AOAC 963.22 (2014), se obtuvieron en intervalos mayormente el ácido docosadienoico (C22:2) desde 57-84%, linoléico (C18:2 n6c) con 4-22%, oleico (C18:1 n6c) con 4-10%, esteárico (C18:0) con 1-3% y palmítico (C16:0) con 2-8%. Se aisló el ácido punícico y para caracterizarlo definitivamente se realizó IR, CG como pruebas confirmatorias. La cromatografía de capa fina y el espectro de infrarrojo permitieron identificar la presencia del ácido punícico, así como la cromatografía de gases permitió la cuantificación del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectó granada en cuatro diferentes estados de maduración y se realizó una limpieza externa de la granada, posteriormente se separaron los arilos de la cáscara y del pericarpio blanco de la granada. Se llevó a cabo el proceso de extracción según las metodologías propuestas por Abbasi *et al.* (2008), y Fadavi y cols.(2006). El aceite obtenido de las semillas se sometió a metilación como lo indica el método oficial AOAC 969.33 (2000), para posteriormente inyectarse y caracterizarse por cromatografía de gases. Se realizó una Cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) con dos finalidades; la primera identificación del ácido punícico y la segunda el aislamiento del mismo ácido y verificar su pureza, esa misma fracción purificada se identificó por Radiación Infrarroja (FT-IR) para observar las bandas características del ácido punícico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El rendimiento de los diferentes métodos de extracción se puede ver en la Tabla I, observando que el método más eficiente, para la separación de los ácidos grasos presentes, en la semilla de granada, fue Soxhlet y como disolvente éter de petróleo, ya que tuvo un rendimiento del 10.85 % en comparación con los otros métodos propuestos. De acuerdo con la literatura, la mayor eficiencia de los disolventes para la extracción del aceite en la semilla de granada propuesta por Shabbir *et al.*, en 2017, son: éter de petróleo > n-hexano > éter etílico. Con base en lo anterior, como se observa en la Tabla I, y lo mencionado por Shabbir cumple lo propuesto.

Tabla I. Rendimiento obtenido del aceite en la semilla por diferentes métodos de extracción.			
Método / Disolvente	Hexano	Éter etílico	Éter de petróleo
Sonicación (10 min)	5.40%	1.55%	6.40%
Agitación (20 min)	5.30%	2.86%	8.15%
Soxhlet (4 h)	-	-	10.85%

El rendimiento de extracción es variable debido a las técnicas y el tipo de disolvente; esto fue comparado con el método de agitación y sonicación usando el mismo disolvente, cabe destacar que al sonicar, las vibraciones producidas por las microondas no son lo suficiente para la extracción ya que es un método rápido y no se logró controlar la temperatura.

Respecto a la agitación, se incrementa el porcentaje de extracción debido a que la superficie de contacto del analito se ve inmersa en el disolvente con un tiempo mayor de extracción y se logró regular la temperatura permitiendo extraer mayormente al analito de interés.

Finalmente comparando ambos métodos con Soxhlet que es un método semicontinuo y con aplicación de temperatura controlada con un tiempo de 4 h este último permite la extracción de los compuestos en una mayor proporción.

Una vez identificado el método adecuado para la extracción, se utilizó para extraer el PSO de otras muestras con diferentes grados de maduración. Como se observa en la Tabla II, el grado de maduración en la granada se vincula con la cantidad de aceite presente; en el fruto verde, el porcentaje de extracción fue muy baja debido a que este fruto era pequeño y predominaba más la cantidad de cáscara o pectina, por lo que las semillas eran de tamaño pequeño e incoloras en comparación de un fruto maduro.

Tabla II. Rendimiento de extracción de aceite en semilla de granada.	
Muestra	Extracción (%)
Muestra 1. Fruto medio maduro	10.85
Muestra 2. Fruto maduro	14.28
Muestra 3. Fruto medio maduro	11.70
Muestra 4. Fruto verde	3.47

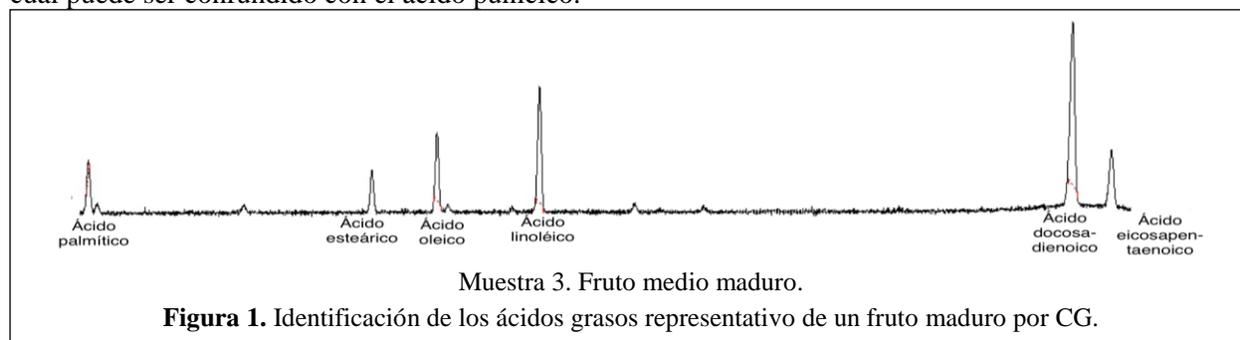
La identificación de los ácidos grasos presentes en la semilla de granada extraída el método de Soxhlet y con base en la AOAC 963.22, con las mismas condiciones que el estándar, se identificaron todos los ácidos grasos, sin embargo se tuvieron dificultades para demostrar la presencia del ácido punícico, ya que la columna utilizada (CP-7420: Select FAME 100 m X 0.25 mm X 0.25 µm) para la caracterización no diferencia entre el ácido punícico y el ácido linolénico

conjugado (CLnA), además que en los artículos de referencia, no se especifica el nombre o proveedor del estándar ni tiempos de retención. Asimismo no anexan cromatogramas.

En la Tabla III, se compara el porcentaje de ácidos grasos obtenidos en el aceite metilado, como se puede observar el ácido docosadienoico se presentó en un 57-86% siendo el mayoritario en cualquier estado de maduración de la granada, seguido del linoléico. En el caso de la muestra 4, el ácido linoleico se encontró en mayor proporción a comparación de los otros tres estados de maduración, alcanzando estar presente en un 22%, cuando en estado maduro se tiene valores del 14% y en estado medio maduro apenas del 4-6%. Cabe destacar que solo en la muestra 2 y 3 se encontró en bajo porcentaje (1.6-3.4%) la presencia del ácido eicosapentaenoico, un ácido graso poliinsaturado esencial y que se conoce como omega-3.

Tabla III. Concentración (%) de ácidos grasos en las diferentes muestras de granada.				
	%Ácido graso			
Ácido Graso	Muestra 1. Fruto medio maduro	Muestra 2. Fruto maduro	Muestra 3. Fruto medio maduro	Muestra 4. Fruto verde
Palmítico C16	2.33	4.23	2.45	8.64
Esteárico C18	1.97	3.08	2.02	3.52
Oleico C18:1	4.64	10.89	3.34	7.52
Linoléico C18:2	4.88	14.62	6.21	22.49
Docosadienoico C22:2	86.18	62.83	84.38	57.82
Eicosapentaenoico C20:5	-	3.35	1.59	-

En el cromatograma para cada muestra, se puede observar en la Figura 1, el ácido predominante para los cuatro casos es el ácido docosadienoico (C22:2), de fórmula molecular $C_{22}H_{40}O_2$, es un ácido graso poliinsaturado PU-6 natural (PUFA). Es un antagonista del receptor 4 de ácido graso libre (FFAR4, también conocido como GPR120) e inhibe fuertemente la secreción de ghrelina por células gástricas de ratón aisladas. Este PUFA ha sido identificado en mamíferos, peces, plantas y hongos anaeróbicos (Cayman Chemica, 2019). También se observa la presencia de linoleico en una cantidad representativa el cual puede ser confundido con el ácido púnicico.



Se realizó cromatografía en capa fina (CCF), con las muestras de aceite de semilla sin metilar, metilada y al no contar con un estándar de comparación, se metiló una muestra comercial, llamada Granagard®, el cual en su etiqueta resalta como componentes mayoritario el ácido púnicico (76.56%), con el fin de comparar los rangos de frente (Rf) e identificar la presencia de ácido púnicico extraído de la semilla. Para determinar la presencia del ácido púnicico, se encontró de acuerdo a Subhash *et al.* (2016), el Rf de este compuesto es de 0.45, mientras que el ácido linoléico, de acuerdo Plourde *et al.*, (2007) tiene una Rf de 0.52. Por lo anterior, se volvió a realizar una CCF únicamente del aceite de semilla sin metilar para poder realizar el aislamiento de los compuestos presentes. Se usó para ello una placa con factor de fluorescencia y se reveló con luz ultravioleta, esto con el fin de poder aislar sin interferencias de un revelador químico. La fracción correspondiente al Rf de 0.45, se aisló en hexano y se empleó para la determinación por IR.

Cómo se observa en la Figura 2, se identificaron las bandas representativas de IR que confirman la presencia de un ácido graso de cadena larga con insaturaciones. De acuerdo a Subhash *et.al* (2016) el IR

que obtuvo, presentó las mismas bandas representativas que se obtuvieron con el IR realizado al compuesto aislado, es decir, presencia de carbonilo (C=O), insaturaciones (C=C), ácido carboxílico (CHO) y la confirmación de ser un compuesto de cadena larga.

Por lo anterior, a pesar de que el ácido predominante fue el docosadienoico, se sospecha que pueda ser el ácido punicico, ya que comparando con lo que Subhash *et al.* (2016) presenta, se encontraron las mismas bandas para las 4 muestras a comparación con lo reportado por estos autores.

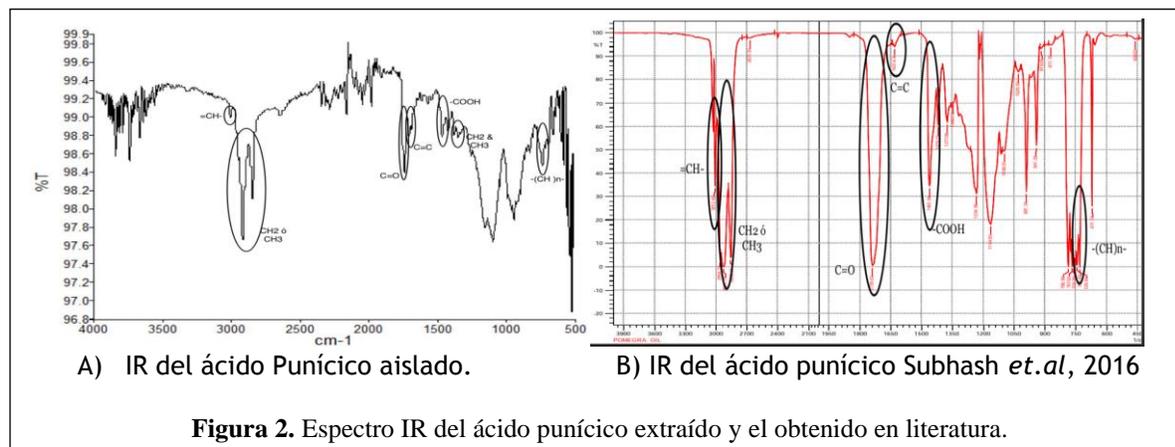


Figura 2. Espectro IR del ácido punicico extraído y el obtenido en literatura.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, H., Rezaei, K., & Rashidi, L. (2008). Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO₂. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(1), 83-89.
- AOAC Official Method 963.22 (2014). Methyl Esters of Fatty Acids in Oils and Fats Gas Chromatographic Method.
- AOAC Official Method 969.33 (2000). Fatty Acids in Oils and Fats Preparation of Methyl Esters Boron Trifluoride Method.
- Banihani S., Swedan S., Alguraan Z. (2013) Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 33(5), 341-348.
- Cayman Chemical (2019). 13Z,16Z-Docosadienoic Acid. Recuperado de: <https://www.caymanchem.com/product/20749/>
- Fadavi, A., Barzegar, M., Hossein, M. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 676-680.
- Goula, A., Adamopoulos, K. (2012). A method for pomegranate seed application in food industries: Seed oil encapsulation. *Food and Bioprocess Technology*, 90(4), 639-652.
- Lansky, E., Newman, R. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 177-206.
- Plourde, M., Destailats, F., Chouinard, P. Y., & Angers, P. (2007). Conjugated α -linolenic acid isomers in bovine milk and muscle. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 5269-5275.
- Shabbir, M. A., Khan, M. R., Saeed, M., Pasha, I., Khalil, A. A., & Siraj, N. (2017). Punicic acid: A striking health substance to combat metabolic syndromes in humans. *Lipids in health and disease*, 16(1), 99.
- Subhash R., Ramesh A., Jaysingrao A., Gopal M. (2016). Isolation of punicic acid from Pomegranate seed oil, its characterization and evaluation for antiatherosclerosis activity. *International Journal of Advanced Research*, 4 (12), 2493-2498.
- Vroegrijk, I., Diepen, J., Berg, S., Westbroek, I., Keizer, H., Gambelli, L., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J., Zondag, G., Havekes, L., Voshol, P. (2011). Pomegranate seed oil, a rich source of punicic acid, prevents diet-induced obesity and insulin resistance in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 49(6), 1426-1430.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
GLOSARIO.....	6
INTRODUCCIÓN	8
1.0 MARCO TEÓRICO.....	10
1.1 Cultivo y clasificación botánica.....	10
1.1.1 Variedades.....	11
1.2 Producción de la granada	13
1.2.1 Producción a nivel mundial.....	13
1.2.2 Producción a nivel nacional	14
1.3 Beneficios de los subproductos de la granada.....	15
1.3.1 Mecanismo de acción propuesto para el PSO.....	16
1.3.2 Efectos a la salud y dosis sugerida del PSO	18
1.3.2.1 Estudios en animales.....	18
1.3.2.1 Suplementación del PSO en sujetos de estudio.....	20
1.4 Síndrome metabólico	21
1.4.1 Estadística Nacional	23
1.5 Chocolate	23
1.5.1 Composición	24
1.5.2 Beneficio a la salud del consumo de cacao	26
OBJETIVOS	28
General	28
Específicos.....	28
2.0 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	29
2.1 Extracción del aceite de granada (Pretratamiento)	30

2.2 Caracterización química del aceite	30
2.2.1 Identificación de los ácidos grasos mayoritarios presentes en el aceite extraído mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF)	30
2.2.2 Identificación por Radiación Infrarroja (IR).....	31
2.2.3 Metilación y cuantificación de ácidos grasos	31
2.3 Elaboración del bombón de chocolate	34
2.4 Análisis composicional del bombón elaborado	34
2.4.1 Humedad	34
2.4.2 Contenido graso.....	34
2.4.3 Cenizas.....	35
2.4.4 Carbohidratos totales (Fenol-Sulfúrico)	35
2.4.5 Proteína cruda	36
2.4.6 Fibra dietética total (FDT)	36
2.4.7 Energía bruta	37
2.5 Análisis específicos.....	37
2.5.1 Polifenoles totales (Folín-Ciocalteau)	37
2.5.2 Cuantificación de Sodio (Na)	38
2.5.3 Perfil de ácidos grasos.....	38
2.6 Análisis de estabilidad oxidativa en el bombón elaborado	39
2.6.1 Pretratamiento de la muestra.....	39
2.6.2 Índice de acidez.....	39
2.6.3 Índice de peróxidos.....	40
2.7 Análisis sensorial	40
2.8 Análisis estadístico.....	40
3.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	41

3.1 Extracción del aceite de granada	41
3.2 Caracterización fisicoquímica del aceite	42
3.3 Análisis composicional del bombón elaborado	51
3.4 Análisis específicos	52
3.4.1 Sodio (Na).....	52
3.4.2 Polifenoles Totales.....	53
3.4.3 Perfil de ácidos grasos.....	54
3.5 Pruebas de estabilidad oxidativa.....	56
3.6 Análisis Sensorial.....	58
CONCLUSIONES.....	61
REFERENCIAS.....	63
APÉNDICE.....	74
PROSPECTIVAS	77

ABREVIATURAS

CLnA: Conjugated Linolenic Acid (ácido linolénico conjugado).

FBS: Fasting Blood Sugar (azúcar en sangre en ayunas).

HDL: High Density Lipoprotein (lipoproteínas de alta densidad).

HOMA-IR: Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (índice de la resistencia a la insulina).

LDL: Low Density Lipoprotein (lipoproteínas de baja densidad).

MUFA: Monounsaturated Fatty Acids (ácidos grasos monoinsaturados).

PPAR: Peroxisome Proliferator Activated Receptor (Receptores activados por proliferadores peroxisómicos).

PSO: Pomegranate Seed Oil (aceite de semilla de aceite de granada).

PUA: Punicic Acid (ácido punícico).

PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids (ácidos grasos poliinsaturados).

RBCM: Red Blood Cell Membrane (membrana de los glóbulos rojos).

SFA: Saturated Fatty Acids (ácidos grasos saturados).

TNF- α : Tumour Necrosis Factor α (factor de necrosis tumoral alfa).

VLDL: Very Low Density Lipoprotein (lipoproteína de muy baja densidad).

GLOSARIO

Antiaterogénico: Inhibición de un conjunto de alteraciones que propician la aparición de un depósito lipídico en las paredes de las arterias que posteriormente se transforman en una placa de calcificación generando la pérdida de elasticidad arterial y otros trastornos vasculares.

Antihiperlipémico: Abate los niveles elevados de glucosa en sangre, evitando la producción de cuerpos cetónicos en el organismo, producidos en el hígado por la degradación de las grasas liberadas al torrente sanguíneo en situaciones de gran deficiencia insulínica.

Antioxidante: Son compuestos químicos que interactúan con los radicales libres y los neutralizan (previenen o retardan), lo que les impide causar daño.

Arilo: Envoltura, casi siempre carnosa y de colores vivos, que tienen algunas semillas.

Auxotrófico: Microorganismo que no puede crecer naturalmente sin un requerimiento nutricional específico, y no posee la capacidad de sintetizarlo.

Balausta: Fruto complejo desarrollado a partir de un ovario ínfero, dividido y contiene muchas semillas carnosas.

Bombón de chocolate: Porción de chocolate que puede llevar en su interior una cierta cantidad de licor o cualquier otro relleno. Se suele consumir de un solo bocado.

Casco de chocolate: Cubierta de chocolate macizo, utilizado para contener un relleno líquido o semisólido.

Clastogénico: Agente mutagénico que da lugar a, o induce a, la interrupción o rotura de cromosomas, lo que lleva a que secciones de cromosomas sean eliminadas, añadidas, o reorganizadas.

Corteza coriácea: Cáscara gruesa que recubre a algunos frutos.

Hs-PCR: Prueba de proteína C-reactiva de alta sensibilidad. Mide la cantidad de proteína C-reactiva (CRP, por sus siglas en inglés) en la sangre. Esta prueba puede ayudar a determinar el riesgo de un ataque al corazón y un ataque cerebral.

Lóculo: pequeña cavidad o compartimento dentro de un órgano o parte de un organismo que contienen los óvulos o semillas.

Mesocarpio o albedo: Capa media de las tres que forman el pericarpio de los frutos (parte carnosa).

Mutagénico: Sustancia que puede producir defectos genéticos hereditarios o aumentar su frecuencia.

Pericarpio: Parte exterior que envuelve las semillas de un fruto.

Prueba de Ames: Ensayo biológico para evaluar el potencial mutagénico de compuestos químicos.

Prueba de aberración cromosómica: Utilizado para identificar sustancias que causan anomalías cromosómicas estructurales (clastogénesis).

Tejido esclerénquima: Tejido de sostén de algunas plantas (elástico) formado por las células muertas a la madurez, cuyas paredes secundarias están engrosadas y endurecidas que consisten en celulosa, hemicelulosa y lignina.

INTRODUCCIÓN

Las investigaciones de plantas medicinales como agentes curativos y preventivos contra enfermedades han ido en aumento debido a la presencia de compuestos químicos activos cuyos mecanismos no están completamente determinados, aunque muchos de sus efectos benéficos han sido puestos a prueba (Boroushaki *et al.*, 2016).

Un ejemplo es la granada (*Punica granatum* L.), utilizada tradicionalmente durante miles de años como un fruto medicinal debido al potencial terapéutico de sus diferentes fracciones, que son ricas en compuestos bioactivos con una gama de efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antiinfecciosos, antiaterogénicos, anticancerígenos y antihiper glucémicos (Banihani *et al.*, 2013).

La granada a menudo se consume como una fruta entera o se procesa en jugo, mermelada, jalea, vino, etc. Principalmente la cáscara, semillas y arilos son considerados residuos en la industria de procesamiento del jugo de frutas (Paul & Radhakrishnan, 2020).

El aceite proveniente de la semilla de granada (Pomegranate Seed Oil, PSO) está constituido entre 65 a 80% de ácidos grasos conjugados, siendo el más importante el ácido punícico (Punicic Acid, PUA), un ω -5 y ácido graso conjugado del ácido linolénico (Conjugated linolenic acid, CLnA) (Abbasi *et al.*, 2008). Diversos estudios le atribuyen la capacidad de ayudar al cuerpo humano a luchar contra enfermedades como cáncer, obesidad, diabetes y enfermedades del corazón (Aruna *et al.*, 2016).

El PSO es un producto inestable propenso a reacciones de oxidación debido a su gran contenido de ácidos grasos insaturados (como CLnA), por lo que su estabilización es necesaria (Paul & Radhakrishnan, 2020).

Los antioxidantes sintéticos, como el butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT) o tert-butilhidroquinona (TBHQ), son utilizados generalmente como agentes para la estabilización de aceites. Drinić *et al.* (2020), mencionan que la alta ingesta de estos compuestos podría generar efectos adversos a la salud por lo que no son seguros. Así que la búsqueda de una matriz rica en antioxidantes es de vital

importancia para la estabilidad del PSO como para su aprovechamiento en el cuerpo humano.

Dos alimentos conocidos por su gran contenido de antioxidantes es el cacao y el café. El cacao es un producto rico en polifenoles, específicamente catequinas (flavan-3-oles) y procianidinas (Afoakwa, 2016).

Así mismo, Afoakwa (2016) menciona que la ingesta de chocolate amargo puede disminuir la presión arterial, mejora el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina en los sujetos, debido a la presencia de estos compuestos.

Mientras que los compuestos bioactivos presentes en el café incluyen la cafeína, ácido fenólico y flavonoides, que lo clasifican como un alimento funcional con propiedades antioxidantes, anticarcinogénicas y antimutagénicas (Suárez *et al.*, 2021).

Considerando lo anterior, se decidió trabajar con chocolate amargo 70% cacao (marca Callebaut-Sicao) y café, para aprovechar sus propiedades antioxidantes ante la inestabilidad oxidativa del PSO.

1.0 MARCO TEÓRICO

1.1 Cultivo y clasificación botánica.

La granada pertenece al orden *Myrtales* y a la familia Punicaceae o Lythraceae. El género *Punica*, descrito por primera vez por Linnaeus (1753), contiene solo dos especies: *P. granatum* L. y *P. protopunica* Balf.

Punica granatum es la única especie cultivada, mientras que *P. protopunica* es una especie silvestre endémica de la isla de Socotra, Yemen (Holland & Bar-Ya'akov, 2018).

Su origen se dio en la región del Himalaya y el Mediterráneo. Aunque las granadas silvestres crecen y se consideran nativas de Asia central, desde Irán y Turkmenistán hasta el norte de la India (Holland *et al.*, 2009).

Las condiciones climáticas óptimas para el crecimiento de granada son climas de tipo mediterráneo, es decir, una alta exposición a la luz solar, inviernos con temperaturas mínimas no inferiores a 12 °C y veranos calurosos y secos sin lluvia durante las últimas etapas del desarrollo del fruto (Levin, 2006).

Dado que el árbol de la granada se adapta muy bien a una amplia gama de climas y condiciones de suelo, se cultiva en muchas regiones geográficas diferentes, principalmente en países tropicales y subtropicales como India, Irán, China y Estados Unidos (Holland *et al.*, 2009; Paul & Radhakrishnan, 2020).

La granada se clasifica como no climatérica; su almacenamiento a baja temperatura mantiene la tasa de respiración por debajo de 8 mL de CO₂ por kg min⁻¹. Debido a la tasa de respiración relativamente baja y la baja producción de etileno desprendido (0.2 mL por kg min⁻¹), la granada debe cosecharse sólo cuando está completamente madura. En caso de ser expuesta a etileno, el efecto del tratamiento decae rápidamente por lo que no afecta significativamente los parámetros de la fruta cosechada, como el color, sólidos solubles totales (TSS), pH o acidez titulable (Holland *et al.*, 2009).

El fruto de la granada se considera como una baya grande y se puede dividir en tres partes: semilla, jugo y cáscara (Mahesar *et al.*, 2019).

1.1.1 Variedades

El fruto se desarrolla a partir del ovario y es una baya carnosa. Está coronado por un cáliz prominente, el ápice puede estar cerrado o abierto según la variedad y el estado de maduración (Holland *et al.*, 2009).

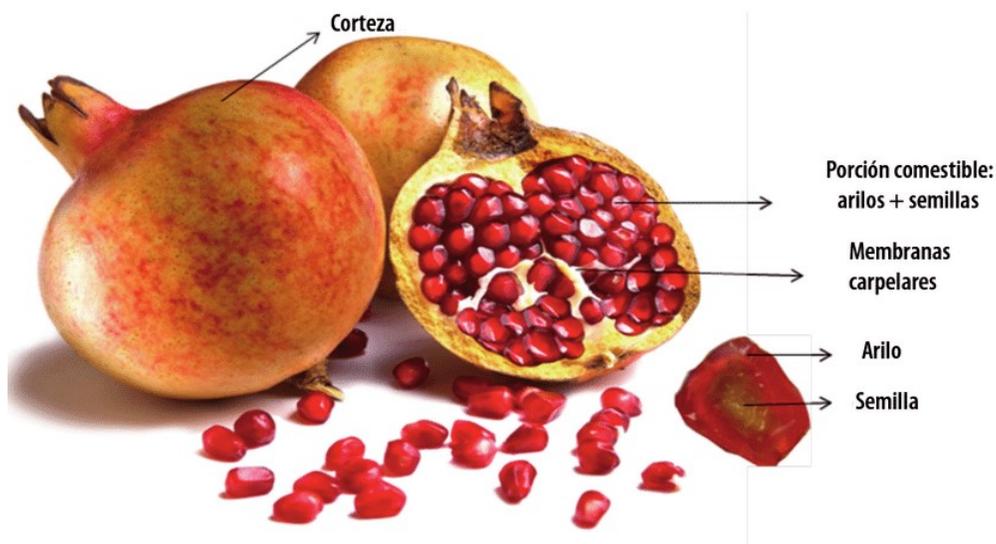


Figura 1. Partes del fruto *Punica granatum*. Recuperado de: (Calín & Carbonell, 2011)

Su corteza coriácea se compone de dos partes: el pericarpio, que proporciona una capa de cutícula y una estera fibrosa; y el mesocarpio (conocido también como albedo), que es el tejido esponjoso y la pared interior del fruto donde se unen los arilos. Como se aprecia en la Figura 1, el fruto se conforma de múltiples lóculos de arilos (que contienen una capa jugosa y constituyen la parte comestible del fruto) separados por paredes membranosas (tabique) y mesocarpio carnoso. Los arilos van desde el rojo intenso hasta prácticamente incoloros, lo cual dependerá del cultivo, variedad y el estado de maduración, mientras que la semilla encerrada varía en contenido de tejido esclerénquima, lo que afecta la suavidad de la semilla (Holland *et al.*, 2009; Stover & Mercure, 2007).

El número de lóculos, arilos y semillas varía, encontrando hasta 1300 semillas por fruto (Levin, 2006; Stover & Mercure, 2007).

De acuerdo con Mahesar *et al.* (2019), la mayoría de los horticultores dividen las variedades de granada en tres categorías: dulces, agridulces y agrias. Mientras que otros autores como Hiwale (2009) dividen la granada en seis grupos según la resistencia de la semilla:

1. Dulce de semillas blandas.
2. Agrio de semillas blandas.
3. Variedad temprana (principalmente dulce).
4. Agridulce de semilla normal (más dura).
5. Dulce de semilla normal (más dura).
6. Agrio (casi siempre semillas normales).

Así mismo, Paul & Radhakrishnan en 2020 reportaron otra clasificación donde los horticultores las engloban principalmente en tres categorías: dulce, agridulce y agria, que nuevamente se divide en seis categorías según la resistencia de la semilla.

La mayoría de los cultivares que se encuentran hoy en día son el resultado de la selección de variedades. Generalmente, se hace una selección de acuerdo con las demandas de los consumidores locales y no para la exportación. Ejemplo de ello, son los cultivares tradicionales indios y españoles que se caracterizan por sus semillas blandas y de sabor ligeramente ácido (Holland *et al.*, 2009).

Holland *et al.* (2009), sugieren que el aumento de la demanda mundial y la importancia económica de las exportaciones de granada sean criterios considerados para la selección del fruto, dando una mayor importancia al tiempo de maduración, la piel y el arilo, así como los beneficios a la salud para los consumidores.

1.2 Producción de la granada

1.2.1 Producción a nivel mundial

De acuerdo con la ONU (2022) se consideran como principales productores mundiales: India y China, seguidos de Irán, Turquía, Afganistán, Estados Unidos, Irak, Pakistán, Siria y España. Actualmente en el mercado europeo, España cuenta con una de las mayores producciones de granadas, llegando a las 50,000 toneladas, su cultivo se concentra principalmente en las regiones de Alicante, Valencia y Murcia.

Los huertos comerciales se cultivan en diferentes escalas en la cuenca del Mediterráneo (África del Norte, Egipto, Israel, Siria, Líbano, Turquía, Grecia, Chipre, Italia, Francia, España, Portugal); y Asia (Jordania, Irán, Irak, Arabia Saudita, Afganistán, Pakistán, India, China, Bangladesh, Myanmar, Vietnam, Tailandia, Kazajstán, Turkmenistán, Tayikistán, Kirguistán, Armenia y Georgia). Las granadas también se cultivan en América del Norte y del Sur (principalmente en EE. UU., Chile, Argentina, Brasil y Perú), en Sudáfrica y en Australia (Holland *et al.*, 2009).

Actualmente no se cuenta con datos completos sobre las áreas cultivadas y la producción de granada en el mundo. La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) no incluye la granada en sus informes. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y la Unión Europea tampoco publican datos sobre la granada (Holland & Bar-Ya'akov, 2018). Sin embargo, se cultiva ampliamente en muchos países donde está bien adaptada, contando con miles de hectáreas productoras (Stover & Mercure, 2007).

Una de las primeras evidencias claras de la presencia de granada en los Estados Unidos fue a principios de 1700, cuando se cultivaban en la Florida española y la Georgia inglesa. Se sabe que este fruto fue introducido en los años 1500 y 1600 por los españoles en América Central, México y América del Sur (Stover & Mercure, 2007).

En México se encuentran diversas variedades como: Mollar valenciana, Wonderfull y Tendral por mencionar algunas (Axayacatl, 2022).

1.2.2 Producción a nivel nacional

En México, la producción de granada alcanza más de 7,000 toneladas (Gobierno de México, 2020). En 2020 el estado de Morelos fue el principal productor de granada en México con 1,545 toneladas (17.6%), seguido por Hidalgo con 1,501 toneladas (17.1%), Oaxaca con 1,304 toneladas (14.9%), Guanajuato con 1,158 toneladas (13.2%) y Chiapas con 945 toneladas (10.7%), por lo que éstas 5 entidades representaron el 73.5% de la producción nacional.

Para ese año se reportó un total de 1,147.8 hectáreas cosechadas, siendo Morelos (con 264 ha), Oaxaca (con 191 ha) y Chiapas (con 185 ha) los estados con mayor superficie cosechada, es decir, 23.0%, 16.7% y 16.1% respectivamente a la superficie nacional total (Axayacatl, 2020).

Varios de los cultivares con los que se cuenta actualmente, se han obtenido por hibridación y selección del fruto en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) (Gobierno de México, 2013).

La falta de información acerca de la calidad de la fruta y productividad que es posible obtener en México, relegó su plantación a zonas tradicionales que no superaban las 600 hectáreas a nivel nacional para el 2013. Aunque su producción ha ido en aumento en los últimos años, llegando a conocerse 1,262 hectáreas productoras para el 2020 (Axayacatl, 2020).

Además, los consumidores desconocen las propiedades nutracéuticas y los beneficios de su consumo (Gobierno de México, 2013). Hoy en día, se cuenta con diversos hallazgos científicos que corroboran el uso tradicional de la granada como remedio médico e indican que los tejidos de la fruta, las flores, la corteza y las hojas de la granada contienen fitoquímicos bioactivos que son antimicrobianos, reducen la presión arterial y actúan contra enfermedades graves como la diabetes y el cáncer (Holland *et al.*, 2009).

1.3 Beneficios de los subproductos de la granada

La producción del jugo a nivel industrial genera subproductos del arilo, que son los restos de la piel, las membranas y las semillas de la fruta.



Figura 2. Compuestos presentes en diferentes partes de la Granada. Recuperado de: (Hou *et al.*, 2019)

Como se muestra en la Figura 2, la piel y membrana del fruto son ricas en elagitaninos y polifenoles (con actividad antioxidante) al igual que el jugo, que posee un valor comercial para los humanos y para la alimentación animal. Por otro lado, las semillas son una fuente de aceite que contiene una amplia combinación de ácidos grasos insaturados y esteroides (Holland *et al.*, 2009).

Las semillas corresponden aproximadamente al 3% del peso total de la fruta, generando entre 12 al 20% de aceite respecto al peso total de la semilla seca. Mientras que, el 30% del peso total corresponde al jugo y el resto corresponde a la cáscara, incluyendo las membranas interiores (Lansky & Newman, 2007).

Los aceites vegetales están conformados por diversos ácidos grasos poliinsaturados con dobles enlaces alternos en concentraciones variables, incluido el aceite de semilla de granada. Este aceite está comprendido principalmente (>70%) por un isómero del ácido linolénico conjugado (CLnA, 18:3 Δ 9cis, 12cis, 15cis) en forma de **ácido punícico (18:3 Δ 9cis, 11 trans, 13cis)** (Mahesar *et al.*, 2019).

El PSO es de gran interés debido a sus efectos fisiológicos sobre diversas enfermedades, que incluyen: propiedades citotóxicas y antitumorales, efectos de reducción de grasa corporal y normalización del metabolismo de los lípidos, mejora el sistema inmunitario in vivo, posee actividad quimiopreventiva contra el cáncer en próstata, mama y colon, reduce la acumulación de triglicéridos hepáticos y favorece la regeneración del tejido epidérmico (Borouhaki *et al.*, 2016), entre otros efectos como antimicrobianos, antioxidantes e inmunomoduladores que se le atribuyen por la presencia de dicho ácido graso (Paul & Radhakrishnan, 2020).

Desafortunadamente, la disponibilidad de ácido punícico está muy limitada por el bajo rendimiento de aceite en las semillas de granada, el cual puede cambiar durante el desarrollo del árbol, el estado de maduración de la fruta, por las diferentes condiciones ambientales y de cultivo, y entre cultivares de granada (Holland *et al.*, 2009).

1.3.1 Mecanismo de acción propuesto para el PSO

Como se mencionó previamente, el PSO es rico principalmente en CLnA. Yuan *et al.* (2015) mencionan que estos ácidos grasos desempeñan un papel fisiológico al regular la expresión y la actividad sobre diferentes receptores, dentro de los cuáles se encuentra la familia de Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales (PPAR, Peroxisomal Proliferator Activated Receptors).

Los PPAR se encuentran en 3 isoformas: PPAR- α , PPAR- β (también llamado - δ), y PPAR- γ , que difieren en su distribución tisular y actividad funcional (Bassaganya-Riera *et al.*, 2011).

Los PPAR- α se expresan en gran medida en tejidos como: hígado, músculo esquelético y corazón. En el hígado controlan el metabolismo de los lípidos, como la captación, activación y oxidación de ácidos grasos, lipólisis, cetogénesis y almacenamiento de triglicéridos. Además, conducen a un aumento de los niveles de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, High Density Lipoprotein) mediante la conversión de colesterol hepático a HDL, lo que reduce los niveles de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, Very Low Density Lipoprotein). Por lo tanto, estos activadores juegan un papel importante en el tratamiento de dislipidemias al disminuir los niveles de triglicéridos en plasma (Mirza *et al.*, 2019).

Los PPAR- β se expresan en varios tejidos implicados en la oxidación de ácidos grasos, curación de heridas, diferenciación de queratinocitos y en la adipogénesis. Al igual que PPAR- α y PPAR- γ , son receptores de ácidos grasos insaturados, su activación conduce a una mejor sensibilidad a la insulina, reducción de la actividad de la lipoproteína lipasa e inhibición de lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoprotein) (Mirza *et al.*, 2019).

Los PPAR- γ se expresa en gran medida en el tejido adiposo y está relacionado con adipogénesis, almacenamiento de lípidos y homeostasis de la glucosa. La Tiazolidinediona (TZD) es un activador del PPAR- γ , se utiliza para mejorar el metabolismo de lípidos y glucosa, aumentar la sensibilidad a la insulina mediante la estimulación de PPAR- γ y para promover la diferenciación de pre-adipocitos junto con la lipogénesis (Mirza *et al.*, 2019). Aunque la TZD es muy eficaz para activar los PPAR- γ , está asociada con efectos secundarios adversos que incluyen aumento de peso, insuficiencia cardíaca congestiva y retención de líquidos, lo que genera la búsqueda de alternativas (Bassaganya-Riera *et al.*, 2011).

Faghihmani *et al.* (2016), mencionan que se han documentado estudios *in vitro* que muestran que el ácido punícico actúa como agonista de los PPAR. Bassaganya *et al.* (2011), demostraron que un aumento dependiente de la dosis de PUA, activaba los PPAR- α y PPAR- γ en células 3T3-L1.

El consumo de PSO como suplemento aumenta significativamente la ingesta diaria de CLnA, que en una persona adulta con una dieta normal no supera los 0.5 - 1 g,

mientras que la ingesta recomendada para lograr un efecto promotor de la salud oscila entre 1.5 y 3.5 g/día (Siano *et al.*, 2016).

1.3.2 Efectos a la salud y dosis sugerida del PSO

1.3.2.1 Estudios en animales

La acumulación de micotoxinas durante el almacenamiento puede aumentar los problemas de toxicidad en los aceites de semillas cuando no se siguen los procedimientos de saneamiento adecuados durante la extracción (Bhat & Reddy, 2017).

En el 2009 Meerts *et al.* analizaron los aspectos toxicológicos y de seguridad del PSO mediante pruebas *in vitro* (Prueba de Ames y Aberración cromosómica) e *in vivo* (toxicidad aguda y toxicidad durante 28 días, en ratas Wistar).

Mediante las pruebas *in vitro* concluyeron: Prueba de Ames indicaba que no se observaba mutagenicidad en concentraciones de 5000 µg PSO /placa (concentración máxima a la que encontraron precipitación de PSO en la placa). Mientras que la prueba de aberración cromosómica indicó que el PSO no era clastogénico ni inducía aberraciones cromosómicas numéricas en concentraciones de 333 µg PSO /mL.

En cuanto a las pruebas *in vivo*: el estudio de toxicidad oral aguda en ratas no reveló resultados significativos con el consumo de 2 g de PSO/kg de peso corporal, concluyeron que el valor de DL50 podría considerarse superior a los 5 g/kg de peso corporal según la directriz de prueba OECD 423 y no se requeriría una clasificación o etiquetado de toxicidad oral para el PSO. Mientras que, en el estudio de toxicidad de 28 días concentraciones de 150,000 ppm PSO en la dieta, aumentaron la actividad de las enzimas hepáticas determinadas en plasma (aspartato, alanina aminotransferasa y fosfatasa alcalina) y la proporción del peso del hígado respecto al peso corporal. Inferieron que esos efectos pudieron deberse a una respuesta fisiológica a la alta dosis de PUA. Concluyeron que, desde un punto de vista toxicológico, esos datos podrían no ser relevantes, ya que PUA ni PSO forman parte

de la dieta normal y no están a altas dosis. Además, reportaron que el NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) de PUA era de 50,000 ppm como PSO, lo que equivale a 4.3 g de PSO/kg de peso corporal al día.

Los estudios realizados y encontrados sobre la dosis efectiva de PSO para observar los beneficios a la salud, son realizados principalmente en modelos animales y muy pocos en humanos (Paul & Radhakrishnan, 2020).

En 2009 McFarlin *et al.*, realizaron un estudio con ratones macho CD-1, encontraron que a pesar de una ingesta similar de energía *ad libitum* entre los dos grupos con aumento de peso, los ratones suplementados con PSO ganaron menos peso, tenían menos leptina y tenían una mayor concentración de adiponectina en comparación con los ratones que no consumieron PSO. Esto se debe a que la leptina es un péptido “marcador” de las reservas energéticas en el organismo, su concentración se correlaciona positivamente con la grasa corporal total, el estado nutricional del individuo y el contenido de triglicéridos de los adipocitos; por lo que, niveles séricos de leptina son elevados en individuos obesos comparados con individuos de peso normal. Mientras que los niveles de adiponectina son inversamente proporcionales al índice de masa corporal (IMC), acumulación de grasa visceral e insulinoresistencia, ya que este péptido incrementa la sensibilidad a la insulina en diversas células epiteliales (López *et al.*, 2009).

En un estudio realizado por Miranda *et al.* (2013) con ratas alimentadas con una dieta obesogénica, observaron que no hubo cambios en el peso del tejido adiposo. La prueba de tolerancia a la glucosa mostró que el valor glucémico en el grupo de animales que consumieron 0.5 g PUA/ 100 g dieta, disminuyó significativamente. Sin embargo, la evaluación del modelo de homeostasis (HOMA-IR) mostró que la resistencia a la insulina no mejoró, además no observaron cambios en el hígado, la composición del músculo esquelético o activación de los PPAR.

La investigación con ratas de Bialek *et al.* (2021), reveló que la administración de PSO al 1% no generó una mejora evidente en la dislipidemia (característica típica en diabetes tipo 2). Sin embargo, si disminuyó la cantidad de triacilglicerol hepático

y la administración de 2 mL kg⁻¹ día⁻¹ del PSO mejoró significativamente la sensibilidad a la insulina en animales con diabetes tipo 2.

1.3.2.1 Suplementación del PSO en sujetos de estudio

Entre los estudios realizados con personas, Yuan *et al.* (2009), investigaron la incorporación y el metabolismo del ácido punícico en sujetos jóvenes sanos, mediante un ensayo controlado aleatorio. Después de 7 días de adaptación con suplementos de semilla de girasol, 30 sujetos fueron divididos entre el grupo control y el grupo prueba (n = 15). El grupo prueba se suplementó 1 vez al día con semillas de pepino chino (*Trichosanthes kirilowii*, TK) que contenían 3 g de PUA en forma de triacilglicérol, durante 28 días. El grupo control recibió semillas de girasol. Encontraron que la proporción de PUA en el grupo prueba, aumentó de 0% a 0.47% en plasma y de 0% a 0.37% en las membranas de glóbulos rojos (RBCM), respectivamente. Concluyeron que el PUA puede incorporarse de manera efectiva en el plasma humano y RBCM, siendo las semillas comestibles de TK una fuente dietética potencial de ácidos linoleicos conjugados.

Mirmiran *et al.* (2010), realizaron un estudio con 51 sujetos hiperlipidémicos, diagnosticados de acuerdo con la definición del Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol (del Instituto Nacional del Corazón, Pulmones y Sangre en USA). Los asignaron al azar a un grupo suplementado con PSO (n=25) y a un grupo control (n=26). El primer grupo fue suplementado con 400 mg de PSO y el grupo control recibió 400 mg de placebo durante 4 semanas dos veces al día. Midieron las concentraciones séricas de lípidos y lipoproteínas antes y después de las 4 semanas. Encontraron que, las concentraciones séricas de colesterol, colesterol LDL, glucosa y las variables de composición corporal permanecieron sin cambios. Sin embargo, encontraron una disminución en los perfiles de lípidos incluyendo triacilglicéridos (TAG) y la relación TAG:Colesterol HDL.

Otro ensayo clínico fue realizado en 2016 por Faghihimani *et al.*, trabajaron con 80 pacientes (28 hombres) diagnosticados con diabetes tipo 2. El grupo de intervención consumió 2 veces al día una cápsula de PSO que contenían 1000 mg (2000 mg en

total al día), mientras que el grupo control recibió placebo, durante 8 semanas. Todos los participantes siguieron con su dieta y medicación habitual. Encontraron que la suplementación diaria de 2000 mg de PSO durante 8 semanas, no generó diferencia significativa en el nivel medio de colesterol total, de TAG, ni de colesterol LDL y HDL. Tampoco hubo diferencia significativa en los niveles de azúcar en sangre en ayunas (FBS, por sus siglas en inglés), insulina, HbA1c (Hemoglobina A1c), alanina transferasa y evaluación del modelo de homeostasis-resistencia a la insulina.

En 2019 Khajebishak *et al.*, trabajaron con individuos que padecían diabetes tipo 2, los dividieron en dos grupos de 26 personas cada uno. El primer grupo consumió diariamente 3 g de PSO en cápsulas de gel blando de 1 g (junto con el desayuno, el almuerzo y la cena) y el segundo, el grupo control consumía parafina como placebo durante ocho semanas. Encontraron que el consumo de PSO redujo los niveles séricos de azúcar en sangre en ayunas, interleucina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Sin embargo, no encontraron diferencia significativa en los niveles de insulina, los perfiles lipídicos y la hs-PCR (análisis en sangre que detecta niveles bajos de proteína C-reactiva). Concluyeron que el PSO se puede utilizar como un agente complementario en el manejo de la obesidad y diabetes tipo 2, aunque se necesitan más estudios clínicos para confirmar los resultados obtenidos.

Los estudios en humanos sustentados por la evidencia científica y los parámetros mencionados como triacilglicéridos, colesterol y diabetes son asociados a un problema conocido como síndrome metabólico (De Filippo, 2021).

1.4 Síndrome metabólico

Las enfermedades cardiovasculares representan una de las causas más frecuentes de mortalidad en los países industrializados y los factores de riesgo tradicionalmente reconocidos (dislipidemia, diabetes tipo 2, tabaquismo) que se observan incluso en pacientes muy jóvenes (De Filippo, 2021).

El síndrome metabólico se define como una agrupación de varios de los siguientes padecimientos: obesidad, diabetes, hiperglucemia, hipertensión arterial y dislipidemia, los cuales están asociados a una insulinoresistencia (De Filippo, 2021).

La obesidad es una enfermedad propensa a ocurrir cuando la ingesta de energía de los alimentos excede a la energía gastada a través de las actividades diarias y el cuerpo almacena el exceso en forma de grasa. La genética es un factor importante, especialmente para determinar la distribución de la grasa (Beckett, 2009).

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina es una hormona que regula el azúcar en la sangre. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos (OMS, 2022a).

Las dislipidemias o hiperlipidemias son trastornos en los lípidos de la sangre caracterizados por un aumento de los niveles de colesterol (hipercolesterolemia) e incrementos de las concentraciones de triacilglicéridos (hipertrigliceridemia). Son trastornos que se presentan regularmente junto con diversas alteraciones como la diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) (Miguel-Soca, 2009).

Se considera que una persona presenta hipertensión cuando su tensión arterial (la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de las arterias) es demasiado elevada. De la tensión arterial se obtienen dos valores: el primero es la tensión sistólica y corresponde al momento en que el corazón se contrae o late, mientras que el segundo, la tensión diastólica, representa la presión ejercida sobre los vasos cuando el corazón se relaja entre un latido y otro. Para establecer el diagnóstico de hipertensión se toma 2 mediciones en días distintos y en ambas lecturas la tensión sistólica ha de ser superior o igual a 140 mm Hg y la diastólica superior o igual a 90 mm Hg (OMS, 2022b).

Entre los factores de riesgo figuran las dietas con consumo excesivo de sal, dietas ricas en grasas saturadas y grasas trans e ingesta insuficiente de frutas y verduras, la inactividad física, el consumo de tabaco y alcohol y el sobrepeso o la obesidad (OMS, 2022a).

1.4.1 Estadística Nacional

De acuerdo con la INEGI en el 2020, alrededor de 151,019 personas fallecieron a causa de la diabetes mellitus, lo cual equivale a 14.0% del total de defunciones (1,086,743) ocurridas en el país; de ellas el 52.0% fueron hombres y 48.0% mujeres.

En México la ENSANUT (2021) reportó que las dislipidemias más comunes en la población mexicana adulta eran triglicéridos altos (47.2%), colesterol HDL bajo (30.8%) y colesterol LDL alto (24.7%). La prevalencia de hipertensión arterial fue del 56.9%, 15.8% para diabetes y un 72.4% de la población padecía obesidad (36.5%) o sobrepeso (35.9%).

Considerando estas cifras y los altos costos económicos que genera la atención de estos padecimientos, se vuelve de suma importancia hacer énfasis en la prevención entre los diferentes grupos poblacionales e iniciar controles en los primeros años de vida para evitar que niños y jóvenes desarrollen enfermedades crónicas a temprana edad, o por lo menos retrasen su aparición (SECTEI, 2020).

1.5 Chocolate

El chocolate es una rica fuente de antioxidantes, principalmente polifenoles, incluidos flavonoides como la epicatequina, la catequina y en particular, procianidinas, las cuales generan una contribución positiva a la nutrición humana a pesar de los altos contenidos de lípidos y azúcares que varían entre los diferentes tipos de chocolate (Afoakwa, 2016).

1.5.1 Composición

De acuerdo con la NOM-186-SSA1/SCFI-2013, el chocolate se clasifica en: amargo u obscuro, semiamargo, blanco, con leche y rellenos. Los cuales difieren en el porcentaje de sus ingredientes como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de diferentes tipos de chocolate. Recuperado de NOM-186-SSA1/SCFI-2013

Producto	Manteca de cacao total	Cocoa desgrasada totalmente	Sólidos totales de cacao	Grasa butírica total	Sólidos totales de leche	Sólidos totales de cacao y leche	Grasa vegetal diferente a la manteca de cacao*
Chocolate	≥ 18.0	≥ 14.0	≥ 35.0				≤ 5.0
Chocolate amargo u obscuro	≥ 22.0	≥ 18.0	≥ 40.0				≤ 5.0
Chocolate semiamargo	≥ 15.6	≥ 14.0	≥ 30.0				≤ 5.0
Chocolate con leche	≥ 20.0	≥ 2.5	≥ 25.0	≥ 2.5	≥ 14.0	≥ 40.0	≤ 5.0
Chocolate con alto contenido de leche	≥ 17.0	≥ 2.5	≥ 20.0	≥ 5.0	≥ 20.0	≥ 40.0	≤ 5.0
Chocolate con leche descremada	≥ 20.0	≥ 2.5	≥ 20.0	≤ 0.5	≥ 14.0	≥ 40.0	≤ 5.0
Chocolate blanco	≥ 20.0		≥ 20.0	≥ 3.5	≥ 14.0	≥ 34.0	≤ 5.0

El cacao y el chocolate son considerados benéficos a la salud, por sus diversos compuestos. Son ricos en minerales esenciales como hierro, cobre, zinc, magnesio, fósforo, manganeso y potasio, los cuales tienen funciones importantes en el metabolismo del cuerpo humano (Beckett, 2009).

Son una de las principales fuentes de polifenoles. En los granos de cacao encontramos: proantocianidinas (aprox. 58%), catequinas o flavan-3-ols (aprox. 37%) y antocianinas (aprox. 4%). La catequina principal y predominante de los granos de cacao es (-)-epicatequina que representa aproximadamente el 35% de la catequina total, es un componente de los taninos del cacao, responsable de los cambios de color y astringencia en los granos y productos elaborados con ellos (Urbańska & Kowalska, 2019).

Entre las procianidinas presentes en el cacao se encuentran: dímeros, trímeros u oligómeros de flavan-3,4-diol. Otros polifenoles incluyen: flavonas (kaempferol, apigenina, luteolina y glucósidos) y ácidos fenólicos (clorogénico, cafeico, ácido

siríngico, cumárico y ferúlico). La composición de los polifenoles depende en gran medida del origen, genotipo, procesamiento del grano y grado de madurez (Urbańska & Kowalska, 2019).

Las metilxantinas como la teobromina ($C_7H_8N_4O_2$, 3,7-dihidro-3,7-dimetil-1H-purina-2,6-diona) y cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$, 1,3,7-trimetilpurina-2,6-diona), representan otro grupo de compuestos bioactivos en los granos de cacao. La relación teobromina:cafeína varía según el genotipo del cacao (Urbańska & Kowalska, 2019).

Un proceso importante al que son sometidos los granos de cacao es el tostado. Este procedimiento se lleva a cabo a temperaturas de $120^{\circ}C-140^{\circ}C$ (durante 10 a 35 min). Las altas temperaturas y la deshidratación que sufren los granos de cacao reducen la concentración de polifenoles y muchos ácidos volátiles, especialmente el ácido acético, responsable de la acidez del producto, pero también estimula la degradación de proteínas, la síntesis de compuestos de azufre, la reacción de Maillard y la caramelización de azúcares, permitiendo la formación de nuevos compuestos que contribuyen al aroma, sabor y color característico del chocolate (Urbańska & Kowalska, 2019).

Otro ingrediente empleado en la fabricación de chocolate es la manteca de cacao, que se compone principalmente de: ácido oleico (34% aprox.), ácido esteárico (34% aprox.) y ácido palmítico (27% aprox.), siendo estos dos últimos ácidos grasos saturados de cadena larga (Beckett, 2008).

Beckett (2009) reporta que, en pacientes con niveles elevados de colesterol, la manteca de cacao tiene un efecto reductor de colesterol LDL en comparación con la mantequilla de vaca. Sin embargo, provoca un aumento de la cantidad de colesterol LDL en comparación al consumo de aceite de oliva. Estos resultados lo atribuyeron a la presencia mayoritaria del ácido esteárico en la manteca de cacao, el cual parece reducir el colesterol HDL en relación con los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Sin embargo, no encontraron evidencia de que la diferencia que genera sea lo suficientemente grande como para traducirse en un mayor riesgo de cardiopatía coronaria.

1.5.2 Beneficio a la salud del consumo de cacao

Afoakwa (2016) reportan que el consumo de cacao y chocolate están asociados con mejoras a corto plazo en la oxidación retardada del colesterol LDL, función endotelial mejorada, disminución de la presión arterial, aumento de la sensibilidad a la insulina y mejora de la función plaquetaria.

El efecto del chocolate amargo sobre la actividad plaquetaria produce una disminución los leucotrienos (LT) y aumenta la prostaciclina (PGI₂) debido a la presencia del ácido araquidónico, generador de hidroperóxidos por la oxigenación de la lipoxigenasa generando un cambio favorable en la protección cardiovascular. Además, otros autores han reportado una disminución del volumen plaquetario y una reducción de la degranulación de las plaquetas (medida como liberación de ADP) tras el consumo de chocolate negro (Afoakwa, 2016).

Los flavonoides presentes en el chocolate tienen una actividad antioxidante significativa, generando una protección en los tejidos ante el estrés oxidativo. Diversos estudios realizados en humanos, donde consumieron chocolate rico en procianidinas muestran una disminución en la oxidación LDL sérica y un aumento de la capacidad antioxidante del plasma (Gómez *et al.*, 2011).

Además, se ha reportado que los flavonoides mejoran la sensibilidad a la insulina, ya que promueve la supervivencia y función de las células β pancreáticas, facilitando la vía de señalización de la insulina en las células hepáticas. Así mismo, modulan la microbiota intestinal, lo que conduce al crecimiento de bacterias que desencadenan una vía antiinflamatoria tolerogénica en el huésped. En un ensayo realizado en voluntarios humanos sanos, el consumo de una bebida de cacao con alto contenido de flavanoles, durante cuatro semanas, demostró aumentar significativamente el crecimiento de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., bacterias capaces de mantener un estado antiinflamatorio en el intestino, en comparación con una bebida de cacao baja en flavanol (Caponio *et al.*, 2020).

El chocolate representa aproximadamente un 14% de la dieta (en términos de aporte energético), incluso en el Reino Unido, donde los niveles de consumo son altos. La mayoría de las encuestas dietéticas realizadas en Reino Unido no han

encontrado conexión entre la obesidad y el consumo de chocolate. Un estudio de la Universidad de Hull (ubicada en Yorkshire, Inglaterra), consistió en adicionar un consumo diario de 45 g de chocolate oscuro en adultos sanos, durante ocho semanas. Como resultado, no se observó un aumento significativo de peso (Beckett, 2008).

Si bien, una gran cantidad de los estudios no respaldan un vínculo entre el consumo de chocolate y la obesidad, un informe del Reino Unido sugiere que el consumo de productos dulces con alto contenido de grasa, pueden ser un factor de la obesidad, dado que el chocolate es un alimento denso en aporte energético y rico en grasas y azúcares, su consumo debe ser limitado (Beckett, 2008).

Cabe mencionar que hoy en día, el riesgo de desarrollar obesidad, diabetes, hiperlipidemias o hipertensión no se atribuye sólo al estilo de vida sino también a factores genéticos. Por lo que es de gran importancia que la composición de la dieta de cada individuo satisfaga las necesidades nutricionales del mismo (SECTEI, 2020).

OBJETIVOS

General

Aprovechar un subproducto de desecho (semilla) de la industrialización del jugo de granada, mediante la extracción del aceite de semilla de granada y su inclusión en un bombón de chocolate amargo, para incrementar las propiedades químicas benéficas del chocolate (perfil de ácidos grasos y polifenoles totales), para su consumo regular y como fuente nutracéutica.

Específicos

- Extraer y caracterizar el aceite proveniente de las semillas de granada para comparar su perfil de ácidos grasos con los reportados por diversos autores.
- Realizar un bombón de chocolate amargo que permita la inclusión del aceite.
- Efectuar un análisis químico proximal al chocolate amargo Callebaut-Sicao y bombón de chocolate suplementado para determinar si la inclusión del PSO y el café en el ganache, genera diferencia significativa en los parámetros (humedad, cenizas, grasa, proteína, carbohidratos y fibra) cuantificados.
- Determinar y comparar el perfil de ácidos grasos en el chocolate Callebaut-Sicao y en el bombón de chocolate suplementado con PSO, para determinar si existe diferencia significativa en los porcentajes de ácidos grasos presentes.
- Cuantificar y contrastar la cantidad de polifenoles totales y sodio, en el chocolate amargo Callebaut-Sicao y en el bombón de chocolate suplementado con PSO.
- Verificar la estabilidad oxidativa del producto desarrollado para estudiar el efecto de la inclusión del aceite y, la estabilidad de este dentro de una matriz rica en polifenoles.
- Evaluar el grado de aceptación del producto desarrollado para su consumo regular, en un grupo poblacional mexicano.

2.0 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El estudio se dividió en dos partes. Como se observa en el Diagrama I, la primera parte constó del pretratamiento de la muestra para la obtención del aceite y su caracterización química.

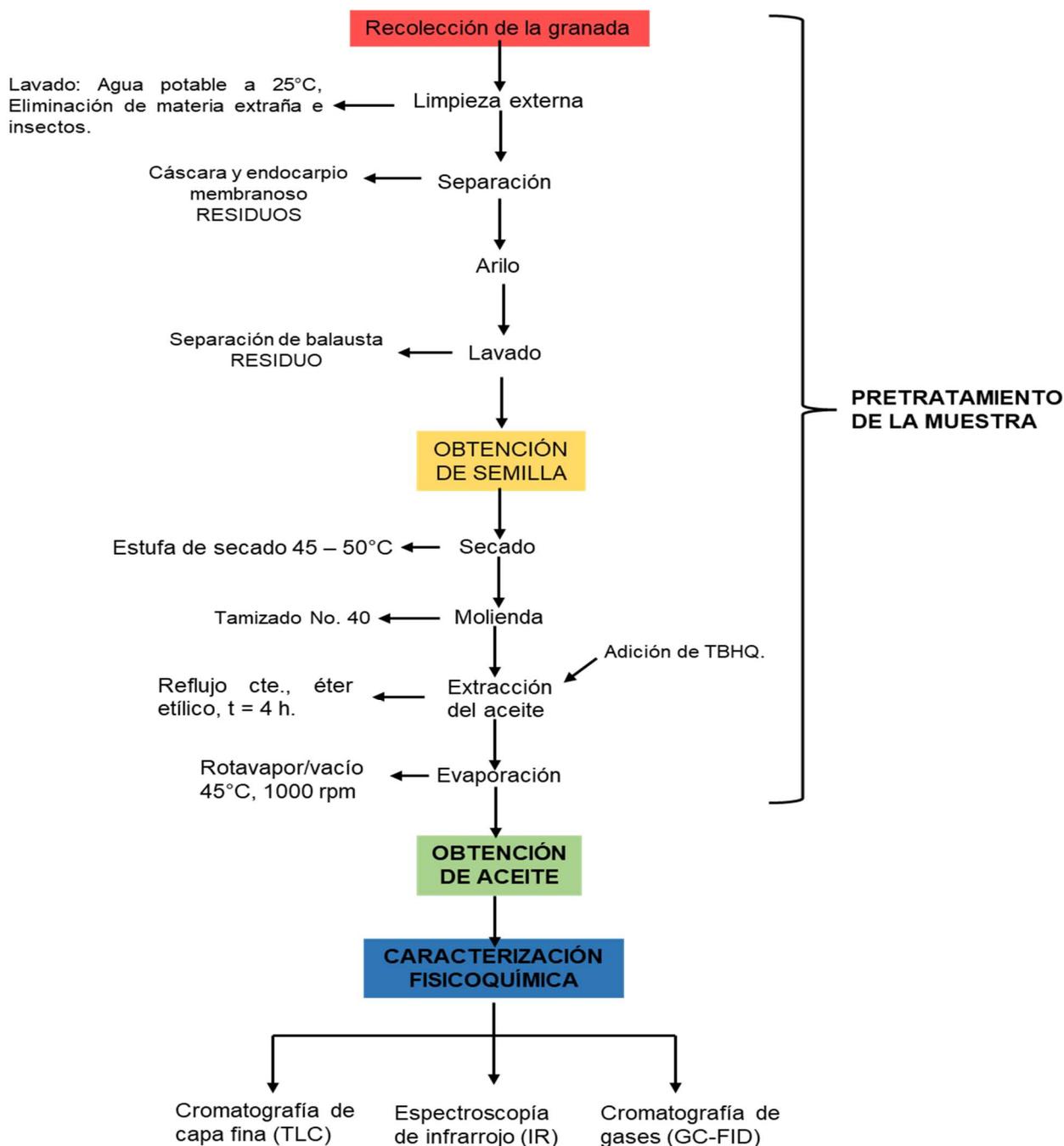


Diagrama 1. Extracción (Pretratamiento) y caracterización físico-química del aceite de semilla de granada.

2.1 Extracción del aceite de granada (Pretratamiento)

La granada se recolectó en el Paraje Potrero San Gregorio y Granja el Progreso, ubicado en Calle Minas No. 36, San Gregorio Atlapulco, Xochimilco. CP. 16600, se realizó una limpieza externa, se separaron los arilos de la cáscara y del endocarpio membranoso (blanco-amarillento) de la misma. Se prensaron manualmente los arilos para evitar el daño físico de las semillas, se lavaron para eliminar los restos de baya globosa (balausta) y otros materiales adheridos.

Se secaron las semillas de la granada en un horno de secado Gravity Oven, LINDERBERG/BLUE, marca Thermo, a temperatura de 45-50°C hasta alcanzar peso constante. Una vez secas, se colocaron en un molino Type CM10, Hamilton Beach hasta obtener un tamaño de partícula de malla 40 (mm 0.42, micras 420, pulgadas 0.0165) por medio de un Tamiz de pruebas físicas Marca Mont Inox (Abbasi *et al.*, 2008).

Para la extracción total del aceite, se pesaron 10 g de semilla seca y molida, se colocaron en un cartucho de celulosa (ID 24.5 mm, ED 26.0 mm EL 60.0 mm) y se calentaron a reflujo constante con 250 mL de éter etílico anhidro A.C.S. marca MEYER, en un sistema Soxhlet durante 4 horas (Abbasi *et al.*, 2008; Fadavi *et al.*, 2006).

Por cada 100 mL se adicionaron 0.5 mg Ter-butilhidroquinona 97% (TBHQ) marca Sigma Aldrich, como antioxidante para evitar comprometer la estabilidad de los ácidos grasos presentes, finalmente se evaporó el disolvente en un rotavapor Marca BUCHI a 45°C, hasta la obtención del aceite.

2.2 Caracterización química del aceite

2.2.1 Identificación de los ácidos grasos mayoritarios presentes en el aceite extraído mediante Cromatografía en Capa Fina (CCF).

De acuerdo con un método establecido por Sita Devi (2003) se utilizaron placas de sílica gel 60 (20 x 20 cm) con indicador de fluorescencia DC-ALLufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ marca Merck. Con ayuda de capilares Yankee (A-2931-length 75 mm ID1.1 mm

Wall 0.2 mm), se aplicaron en distintos carriles, 3-5 veces (10 µL) el aceite extraído metilado y sin metilar, así como un estándar de methyl punicate (Matreya LLC). Se usó como fase móvil una mezcla de hexano (95% HPLC, J.T. Baker) /éter etílico (A.C.S. MEYER) en proporción 94:6 respectivamente. La placa se observó en un cuarto oscuro con una lámpara UV de onda corta y larga, Marca Mineralight multi D lamp, UVSL 25, para revelar el patrón de elución de los compuestos.

Finalmente, se midió el factor de retención (Rf) de cada mancha obtenida en la placa comparado con estándar de ácido punícico, ácido linoléico, ácido linolénico y una pastilla comercial GranaGard® metilados.

2.2.2 Identificación por Radiación Infrarroja (IR)

Siguiendo el método utilizado por Mahesar *et al.* (2019), se aisló el ácido punícico mediante el raspado de la placa, se disolvió en 5 mL de hexano, se filtró por filtración rápida y se recuperó en viales para su identificación. Se analizó el espectro electromagnético de la fracción correspondiente al ácido punícico en FT-IR Spectrometer Perkin Elmer Spectrum Two (UATR Two, Waltham Massachusetts EE. UU.), con un detector MIR de LiTaO₃ a temperatura ambiente y un detector MIR DTGS de temperatura estabilizada y SNR de 14500.

2.2.3 Metilación y cuantificación de ácidos grasos

Se empleó el procedimiento descrito en el método AOAC 969.33 (2005), que consistió en pesar 0.5 g de aceite de semilla de granada en un matraz de bola de dos bocas, se colocó a reflujo (80°C) y con agitación constante con 10 mL de hidróxido de sodio (NaOH, ACS MEYER) en metanol (CH₃OH-HPLC J.T.Baker) 0.25 N, hasta disolver los glóbulos de grasa (aproximadamente 5 min), posteriormente se agregaron 10 mL de trifluoruro de boro (B₃F, Aldrich 14% in methanol) y se dejaron 45 min en reflujo. Pasado este tiempo, se agregaron 5 mL de hexano (C₆H₁₄ grado HPLC JT. Baker) y se dejó 2 min más. Se separaron las fases en un embudo de separación y se realizaron tres lavados con 5 mL de hexano

cada uno, recuperándose la fase orgánica, se secó con sulfato de sodio anhidro (A.C.S. - J.T. Baker), se filtró y aforó a 50 mL con hexano. Por último, se filtró por acrodisco Millex® de 0.45 µm para su posterior inyección.

De acuerdo con lo establecido por Fadavi *et al.* (2006) y la metodología AOAC 963.22 (2005), se empleó un cromatógrafo de gases (AutoSystem XL marca Perkin Elmer, Waltham Massachusetts EE. UU.) acoplado a un detector de flama (FID) con una columna CP7420 Select FAME Agilent Technologies (100 x 0.2 mm x 0.25 µm). Las condiciones de trabajo fueron: flujos de N₂: 30 mL/min, H₂: 45 mL/min y de aire 450 mL/min, inyector a 220°C, horno inicialmente a 100°C durante 5 minutos, a razón de 4°C/min hasta 240°C que se mantuvo por 25 min, el detector se mantuvo a 280°C en modo SPLIT. El tiempo de cada corrida fue de 65 minutos. Se utilizó como estándar de ácidos grasos FAME Mix-37 marca Supelco Sigma Aldrich. Finalmente se inyectó 1 µL del estándar, así como de la muestra.

Posterior a la caracterización del aceite, se elaboró un bombón de chocolate amargo suplementado con 1% de PSO en su relleno. Como se observa en el Diagrama 2, se le realizaron pruebas de estabilidad (para evaluar el comportamiento del PSO en una matriz rica en antioxidantes), sensoriales (realizada con consumidores) y composicionales para determinar los macronutrientes, así como de algunos componentes específicos (polifenoles totales y sodio).

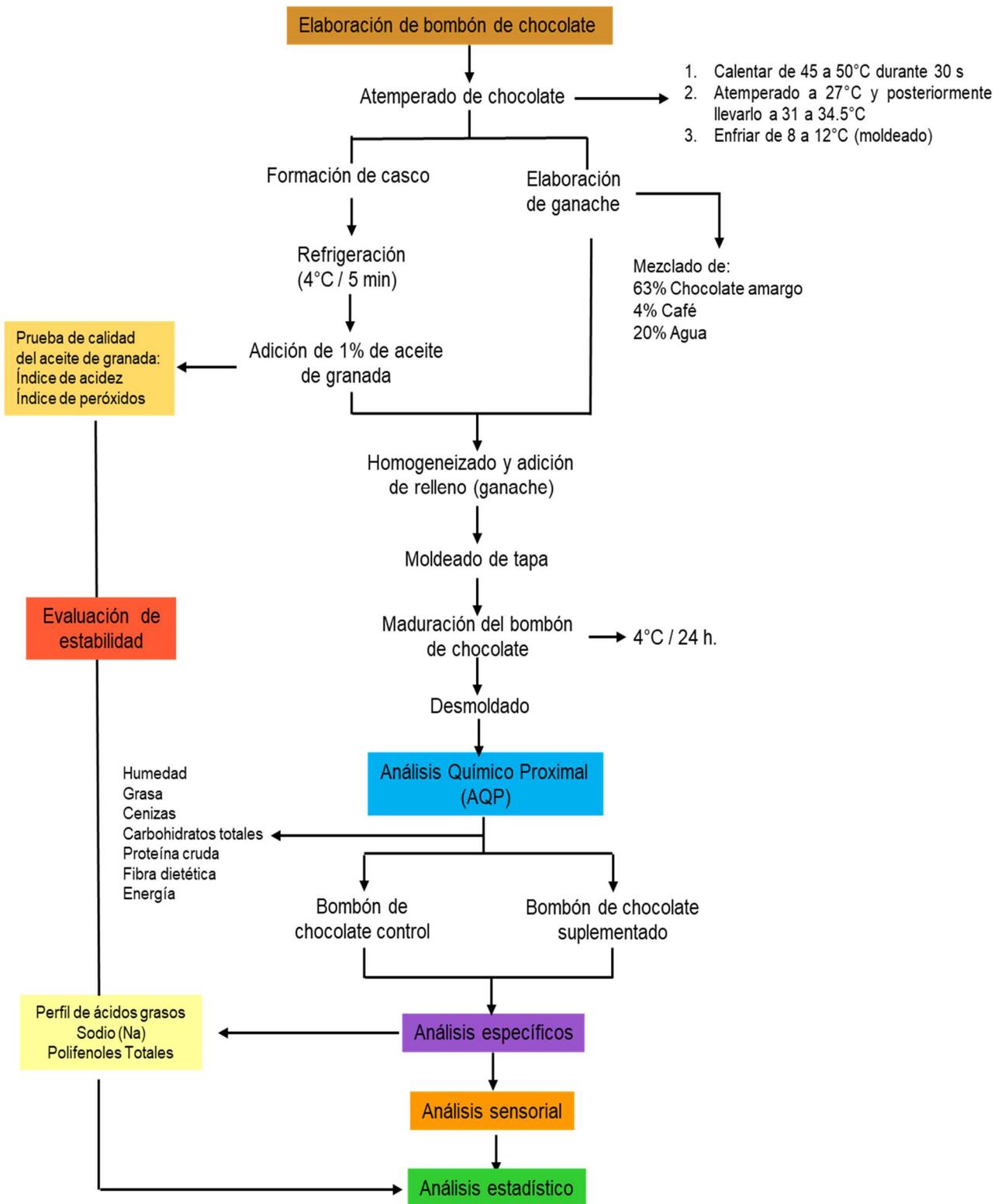


Diagrama 2. Preparación y análisis de bombón de chocolate relleno con 1% de aceite de *Punica granatum* L.

2.3 Elaboración del bombón de chocolate

Se elaboró un bombón (chocolate relleno) con chocolate amargo Callebaut Sicao 70% cacao, el cual se fundió a temperatura de 45 a 50°C durante 30 segundos, se atemperó a 27°C y posteriormente se llevó de 31 a 34.5°C y, se moldeó entre 8 a 12°C para la formación del casco del bombón. A 25°C se adicionó una ganache con 1% de aceite de semilla de granada (63% chocolate amargo, 4% café y 20% agua) y se adicionó como relleno. Se cubrió con chocolate previamente atemperado para la formación de la base y se dejó madurar durante 24 h a 4°C.

2.4 Análisis composicional del bombón elaborado

Con la finalidad de conocer la composición química del bombón elaborado, se realizó un análisis químico proximal que constó de las siguientes determinaciones:

2.4.1 Humedad

De acuerdo con lo establecido en el método AOAC 931.04 (2008), se pesaron 2 g muestra (triturada y homogenizada) en un plato de pesaje previamente puesto a peso constante, se llevó a una estufa a 100°C por 24 h. Pasado el tiempo se dejó enfriar en un desecador y se registró el peso. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto al peso de la muestra.

2.4.2 Contenido graso

Siguiendo el método AOAC 963.15 (2006), se pesaron 5 g de muestra en un vaso de precipitados, se agregaron 45 mL de agua hirviendo y se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. Se añadieron 55 mL de ácido clorhídrico (HCl) 8 N (2+1) y piedras de ebullición. El vaso se cubrió con un vidrio de reloj y se llevó lentamente a ebullición, manteniendo la condición durante 15 minutos.

Una vez fría la digestión, se filtró a través de papel estriado medio S&S 589 de 15 cm, y se realizaron tres lavados al vaso con 30 mL de agua destilada, cada uno. Se secó el papel con la muestra en la estufa a 100°C durante 24 h. Una vez seco se pasó a un cartucho de celulosa desgrasado, se cubrió con algodón y se introdujo al

equipo Soxhlet; por destilación a reflujo con 200 mL de éter etílico ($(C_2H_5)_2O$) durante 4 horas.

Una vez pasado el tiempo se evaporó el disolvente y se dejó secar el matraz en una estufa a $100^{\circ}C$ hasta peso constante (1 h aproximadamente). Se dejó enfriar en el desecador a temperatura ambiente y se pesó; los resultados se expresaron en porcentaje (g grasa / 100 g muestra).

2.4.3 Cenizas

De acuerdo con el método AOAC 972.15 (2005), se pesaron 5 g de muestra en un crisol previamente puesto a peso constante y pesado, se carbonizó la muestra dentro de una campana de extracción hasta que cesó el humo y se llevó a la mufla previamente calentada a $600^{\circ}C$ durante 2 horas.

Pasado el tiempo se sacó el crisol con cenizas y se dejó enfriar en un desecador. Una vez frío se registró el peso, los resultados se expresaron en porcentaje (g ceniza / 100 g muestra).

2.4.4 Carbohidratos totales (Fenol-Sulfúrico)

Se realizó un extracto acuoso utilizando 1 g del bombón (previamente homogeneizado), se disolvió en 200 mL de agua destilada. Se realizaron diluciones a modo que los carbohidratos se encontraran en el intervalo de sensibilidad del método (10-100 $\mu g/mL$) (Dubois *et al.*, 1956).

Se colocó 1 mL de las diluciones en tubos de ensaye previamente etiquetados, se añadieron 0.6 mL de una solución de fenol (C_6H_6O) al 5%, se mezcló y se agregaron 3.6 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado y se homogeneizó.

Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se cuantificó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Lamda 2 marca Perkin Elmer) a 480 nm, frente a un blanco de reactivos. Para calcular la concentración de la muestra se empleó una

curva patrón tratada de la misma forma que la muestra. Los resultados se expresaron en porcentaje (g de glucosa / 100 g muestra).

2.4.5 Proteína cruda

Siguiendo la metodología establecida en AOAC 988.05 (2005), se pesaron 0.5 g de muestra en un tubo Kjeldahl, se añadieron 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado, 0.5 g de sulfato de cobre ($CuSO_4$) y 1.5 g de sulfato de sodio (Na_2SO_4). Se colocaron los tubos en el digestor, se dejaron durante 2 horas aprox. (hasta que el color de la muestra se tornó verde-turquesa translúcido). Se dejaron enfriar los tubos a temperatura ambiente.

Una vez fría la mezcla de digestión, se neutralizó con solución hidróxido de sodio (NaOH) 36% en un equipo de destilación por arrastre de vapor y se utilizó ácido bórico (H_3BO_3) 3% con mezcla de indicadores para recuperar el amoníaco destilado. La solución resultante se valoró con ácido clorhídrico (HCl) 0.106 N y se realizó el cálculo estequiométrico utilizando un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6.25, para expresar los resultados en porcentaje (g proteína / 100 g muestra).

2.4.6 Fibra dietética total (FDT)

De acuerdo con el método AOAC 993.21 (2005), se colocaron a peso constante crisoles con 0.5 g de celita perfectamente distribuida. Posteriormente se sacaron y se dejaron enfriar en un desecador y se registraron sus pesos.

Se pesaron por duplicado 500 mg muestra seca y homogeneizada en matraces Erlenmeyer, se añadieron 25 mL agua destilada y se agitó hasta disolver la muestra. Se taparon con papel aluminio y se dejaron en reposo durante 90 minutos en un baño de agua a 37°C. Pasado el tiempo se les añadió 100 mL de etanol 95% a cada matraz y se dejaron reposar una hora a 25°C.

Sobre un matraz kitasato se colocó el crisol con celita y se conectó al vacío para recolectar el precipitado. Los residuos en el matraz Erlenmeyer se lavaron con 20

mL de etanol al 78% (x2), luego con 10 mL de etanol 95% (x2) y con 10 mL de acetona (x1).

Los crisoles con residuos se secaron en estufa a 105°C. Se dejaron enfriar en el desecador y se pesaron. Uno de los crisoles del duplicado, se colocaron en la mufla a 600°C durante 2 h, se dejó enfriar en un desecador y se pesó para determinar el porcentaje de cenizas en el residuo. Mientras que el otro crisol con residuo se utilizó para determinar proteína por el método Kjeldahl. Los resultados se expresaron en porcentaje (g FDT / 100 g muestra).

2.4.7 Energía bruta

Se siguió el método establecido en la ASTM (1974). Se pesó 1 g de ácido benzoico, como patrón calorimétrico se colocó con una cinta dentro de la bomba calorimétrica (6400 Automatic Isoperibol Calorimeter marca Parr Instrument Company, Moline Illinois EE. UU.) y se cerró herméticamente. Después de unos minutos, el equipo arrojó el resultado en Kcal/g. Se realizó el mismo procedimiento para las muestras experimentales.

2.5 Análisis específicos

2.5.1 Polifenoles totales (Folín-Ciocalteau)

En un vaso de precipitados se pesaron 10 g de chocolate, se mezclaron con 50 mL agua hirviendo y 3 gotas de HCl concentrado, se homogeneizó perfectamente y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 80 mL de éter etílico y se traspasaron a tubos falcón para centrifugar (SORVALL Biofuge Primo R) a 2500 rpm durante 5 minutos. Se recuperó la fase orgánica en un matraz Erlenmeyer y se realizaron lavados hasta desengrasar completamente la muestra.

La fase acuosa que contenía la muestra desengrasada se recuperó y secó en estufa a 50°C durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se sacó y se dejó enfriar a temperatura ambiente (Matthäus, 2002).

Para la cuantificación se siguió el método descrito por Hu *et al.* (2016), se pesaron 0.1 g de muestra y se extrajeron los compuestos con 4 mL de metanol al 70%. En un tubo de ensayo se colocaron 100 µL del extracto, se adicionaron 2 mL de Na₂CO₃ al 2% dejándolo en reposo 2 minutos. Pasado ese tiempo se agregaron 100 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu, diluido previamente con agua destilada 1:1. Se dejó reposar en un cuarto oscuro durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia de la solución a 750 nm en un espectrofotómetro de UV-VIS (Lambda 2 marca Perkin Elmer, Waltham Massachusetts EE. UU.).

Para obtener la concentración de polifenoles se realizó una curva patrón con ácido gálico monohidratado como estándar, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Los resultados se expresaron como mg EAG (Equivalentes de Ácido Gálico) / g de chocolate desengrasado.

2.5.2 Cuantificación de Sodio (Na)

De acuerdo con la AOAC 985.35 (2005), se cuantificó sodio mediante espectrometría de absorción atómica. Las cenizas obtenidas (descrito en el punto 2.4.3), se digirieron en 10 mL de ácido clorhídrico al 25% durante 15 minutos en ebullición. Pasado el tiempo se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se vertieron en un matraz aforado volumétrico de 50 mL, se llevaron al volumen de aforo y se filtraron sobre papel Whatman N°4.

Se determinó el contenido de sodio en solución mediante un espectrómetro de absorción atómica (Analyst 100 marca Perkin Elmer, Waltham Massachusetts EE. UU.) a una longitud de 589 nm y slit de 0.2 nm, junto con una curva patrón (0.2 - 1.2 ppm). Los resultados se expresaron en mg de Na / 100 g muestra.

2.5.3 Perfil de ácidos grasos

Se empleó el mismo procedimiento descrito en el punto 2.2.3.

2.6 Análisis de estabilidad oxidativa en el bombón elaborado

Para verificar la estabilidad del aceite de semilla de granada extraído y el adicionado en el producto elaborado, se analizaron durante 3 meses los siguientes parámetros: perfil de ácidos grasos (al inicio y al final del estudio), índice acidez e índice de peróxidos (cada 15 días). El producto elaborado se sometió a temperatura ambiente (21-23°C en un lugar seco y fresco) y a refrigeración, ambos envueltos en papel aluminio. El aceite se almacenó a temperatura ambiente en un lugar fresco y sin luz.

2.6.1 Pretratamiento de la muestra

Para la realización de las siguientes técnicas se extrajo, la grasa presente en el producto elaborado y se siguió el método establecido en AOAC 920.75 (2005).

Se pesaron 15 g de muestra en un vaso de precipitados, se agregaron 50 mL agua hirviendo y 3 gotas de HCl concentrado, se homogeneizó y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadieron 80 mL de éter etílico y la mezcla se pasó a tubos falcón para centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm. Se recuperó la fase orgánica y se realizaron 2 lavados más con 60 mL de éter. Se recolectaron todas las fases orgánicas, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente.

Con el aceite extraído se realizaron las siguientes determinaciones:

2.6.2 Índice de acidez

Para esta determinación se empleó el método descrito en la NMX-F-101-SCFI-2012. En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesaron 0.5 g de grasa, se agregaron 50 mL de una mezcla alcohol etílico/éter (50:50) y se agitó hasta la disolución completa de la grasa. Se añadieron 2 gotas de fenolftaleína al 1% y se tituló con una solución de hidróxido de sodio 0.01 N valorada, agitando frecuentemente hasta la persistencia por 30 s de una coloración rosada. Los resultados se expresaron en % Ácidos grasos libres como ácido oleico.

2.6.3 Índice de peróxidos

De acuerdo con el método establecido en la NMX-F-154-SCFI-2010 y a Crowe & White (2001) se adaptó un micrométodo que consistió en pesar 0.5 g de grasa en un matraz Erlenmeyer de 125 mL se adicionaron 2.5 mL de una solución de ácido acético/diclorometano (3:2 v/v), disolviendo perfectamente. Se añadieron 0.05 mL de una solución saturada de yoduro de potasio, se tapó con papel aluminio y dejó reposar en la oscuridad durante 60 s con agitación constante.

Pasado ese tiempo se agregaron 7.5 mL de agua desionizada hervida y fría y 0.1 mL de solución de almidón indicador. Se tituló lentamente con tiosulfato de sodio 0.001 N hasta la desaparición total del color azul. Los resultados se expresaron como meq O₂ / kg muestra.

2.7 Análisis sensorial

Se realizó un análisis sensorial con 54 consumidores mayores de 20 años, procedentes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Se les pidió comparar dos muestras: un bombón elaborado con chocolate amargo al 70% de cacao Callebaut-Sicao, café y 1% de aceite de semilla de granada vs. un bombón de chocolate control (elaborado de la misma forma, sin la inclusión del aceite de semilla de granada).

Los participantes evaluaron tres atributos: acidez, amargor y dulzura. Así mismo se les preguntó si percibían otros atributos en los bombones de chocolate como: textura no deseada, olor no característico, falta de dulzor, notas de tostado, color no atractivo, sensación grasa y sensación rancia. Finalmente, se les preguntó cuál chocolate preferían y si consumirían el producto desarrollado considerando los beneficios que proporciona.

2.8 Análisis estadístico

Para la comparación de las muestras en el análisis químico proximal y las pruebas específicas se realizó la prueba t de Student. Para el análisis sensorial se aplicó

ANOVA con un solo factor, para identificar si había diferencia significativa entre el bombón de chocolate control y el producto desarrollado.

3.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Extracción del aceite de granada

Para este proyecto se utilizaron 25 kg de granada proveniente del Paraje Potrero San Gregorio y Granja el Progreso, ubicados en San Gregorio Atlapulco, Xochimilco. Se realizó una limpieza externa, se separaron la cáscara y el endocarpio membranoso, se extrajo el jugo y se secó la semilla.

De la semilla seca y molida se extrajo el aceite. Para elegir el método de extracción, se consideró la disponibilidad de materiales y equipos, se contemplaron diversos métodos y se optó por el de mayor rendimiento: Soxhlet, uno de los métodos más comunes y utilizados a escala laboratorio (Paul & Radhakrishnan, 2020).

Se priorizó la estabilidad de los ácidos grasos presentes, se mantuvieron temperaturas constantes y no se sometieron a procesos térmicos mayores a 80°C, además, se adicionó ter-butilhidroquinona (TBHQ) como antioxidante en una concentración de 5 ppm, con la finalidad de retardar la oxidación del aceite.

Se observó que por cada kilogramo de granada (peso del fruto completo) se obtenían 33.128 g de semilla seca en promedio (3.31% respecto al peso total). De acuerdo con Mahesar *et al.* (2019) y Siano *et al.* (2016) el porcentaje de semilla seca en la granada se encontraba alrededor del 3%, es decir por cada kilogramo de fruta habían 37–143 g aprox. de semilla seca. Concluyeron que la cantidad de semilla dependía de la variedad de granada (que además afecta la composición química del aceite como de la fruta en general).

En cuanto a la extracción del aceite de semilla de granada, se obtuvieron 177.3 g de aceite por cada kg de semilla seca. Comparando lo obtenido con los estudios de Parashar (2010), quién trabajó con diferentes muestras de granada y el mismo método de extracción, encontró que el contenido lipídico para la variedad agridulce

se encontraba ente 51 a 66 g / kg de semilla seca, en variedad agria oscilaba de 135 a 152 g / kg, mientras que en la variedad dulce iba de 98 a 108 g / kg, además referenció resultados donde obtuvieron valores entre 140–270 g aceite/ kg de semilla seca en una variedad no especificada, lo que indicó que la variedad y el estado de maduración del fruto influye directamente en el rendimiento de extracción del aceite, por el mismo método. El contenido que se obtuvo de aceite se encontró dentro de los intervalos mencionados por otros autores, sin embargo, no se pudo comparar la eficiencia de extracción al desconocer la variedad con la que se trabajó.

Por lo tanto, se esperaría que el perfil lipídico también se vea afectado por el tipo de variedad, obteniendo un perfil diferente al que reportan otros autores, manteniendo al ácido punícico como uno de los ácidos grasos mayoritarios al igual que los ácidos conjugados del ácido linolénico.

3.2 Caracterización fisicoquímica del aceite

Para la identificación de los ácidos grasos presentes en el aceite, se realizó una cromatografía en capa fina (CCF) donde se compararon tres estándares: ácido punícico, ácido linoleico y ácido linolénico.

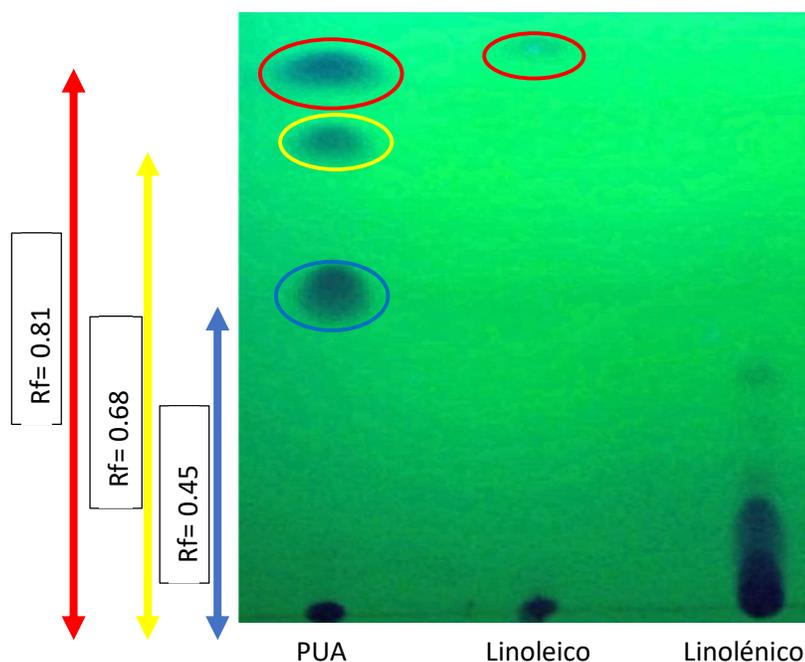


Figura 3. Cromatografía en capa fina de los estándares: ácido punícico, ácido linoleico y ácido linolénico metilados.

Cómo se observa en la Figura 3, el estándar de PUA se disgregó en 3 manchas mayoritarias al eluir 3 veces con la fase móvil, de esta placa se identificaron y confirmaron los valores mencionados por Sita Devi (2003), el ácido punícico con Rf de 0.45 y el ácido linoleico con Rf de 0.81. En el caso del ácido linolénico, no se observó un desplazamiento de la aplicación lo cual pudo deberse a la afinidad del compuesto con la fase móvil utilizada.

Por lo tanto, el estándar puro de ácido punícico, estaba compuesto por su isómero ácido linoleico y otro isómero no identificado (Rf=0.68).

Se espera ver un comportamiento de elución similar (mismos factores de retención) al estándar de PUA en las muestras, además de la presencia de otros ácidos grasos minoritarios.

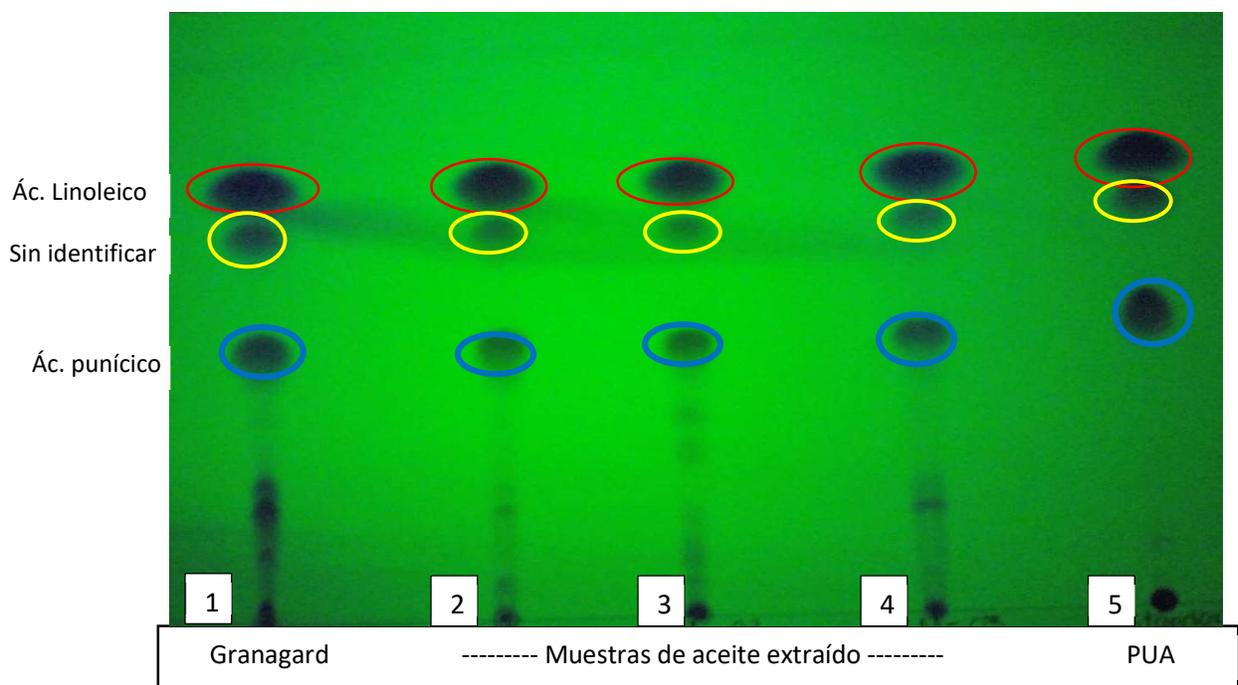


Figura 4. Cromatografía en capa fina de cápsula comercial Granagard metilada (1), muestras de PSO extraído y metilado (2,3,4), y estándar de metil punícico (5).

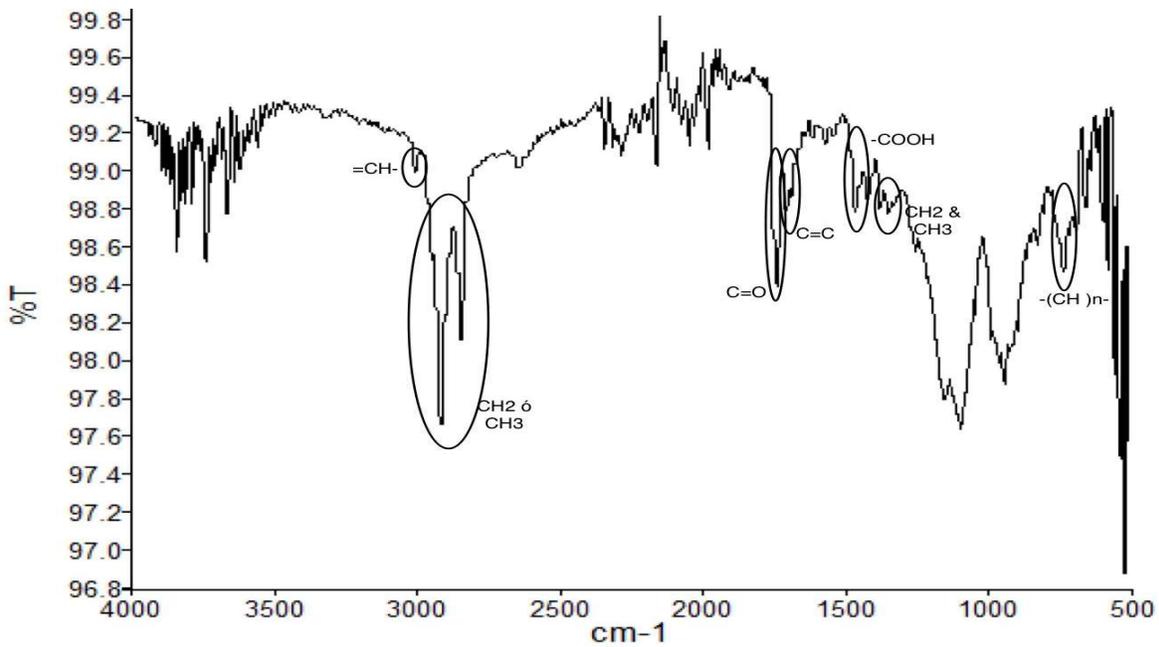
En la Figura 4 se comparó el patrón de elución de 5 muestras: el carril 1 correspondió a una pastilla comercial, Granagard®, la cual consistía en una cápsula

de 0.64 g con una nanoemulsión de aceite de semilla de granada, recomendado como suplemento alimenticio (consumo diario de 1-2 cápsulas en el desayuno), para su identificación, se sometió el contenido de una cápsula a un proceso de metilación y se obtuvieron los ésteres metílicos. Las muestras aplicadas en los carriles 2, 3, 4 correspondieron al aceite extraído en diferentes tiempos del proyecto, que también fueron metiladas. Por último, se aplicó el estándar de ácido punícico metilado en el carril 5.

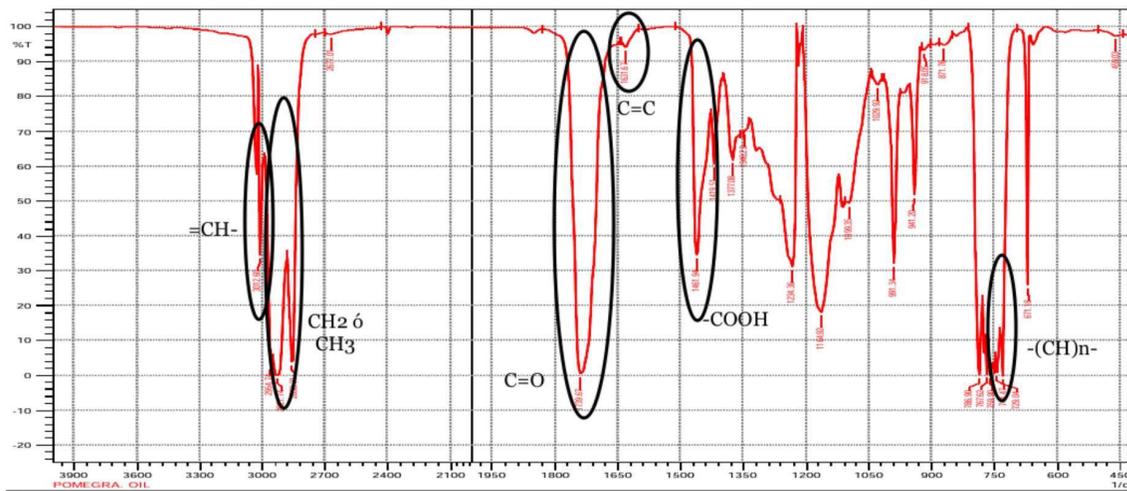
En las cinco muestras que se aplicaron, se observó la presencia de tres manchas predominantes que corresponden al ácido linoleico ($R_f = 0.81$), ácido punícico ($R_f = 0.45$) y a otro isómero de este (con R_f de 0.68) no identificado.

En la pastilla comercial también se observó la presencia de otros ácidos grasos con valores de R_f menores, los cuales, de acuerdo con la información nutrimental de la pastilla, deben corresponder a ácidos grasos saturados y monoinsaturados no especificados. Lo mismo sucedió con las muestras 2, 3, 4 correspondientes al PSO extraído. De acuerdo con Mahesar *et al.* (2019) las fracciones que se observaron correspondían principalmente al ácido punícico, seguido de otros ácidos grasos que están en menor porcentaje como el ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico.

Una vez que se identificó la fracción correspondiente al ácido punícico (C18:3 N5) presente en el aceite de semilla de granada extraído, se procedió a su aislamiento mediante el raspado de la fase estacionaria de la placa. Se resuspendió en hexano y se guardó para su uso posterior en estudios con células cancerígenas, con el propósito de estudiar su poder antiinflamatorio (APÉNDICE) y, también se utilizó para la caracterización por espectroscopia infrarroja (IR-FT).



A) IR ácido púnico aislado del aceite extraído.



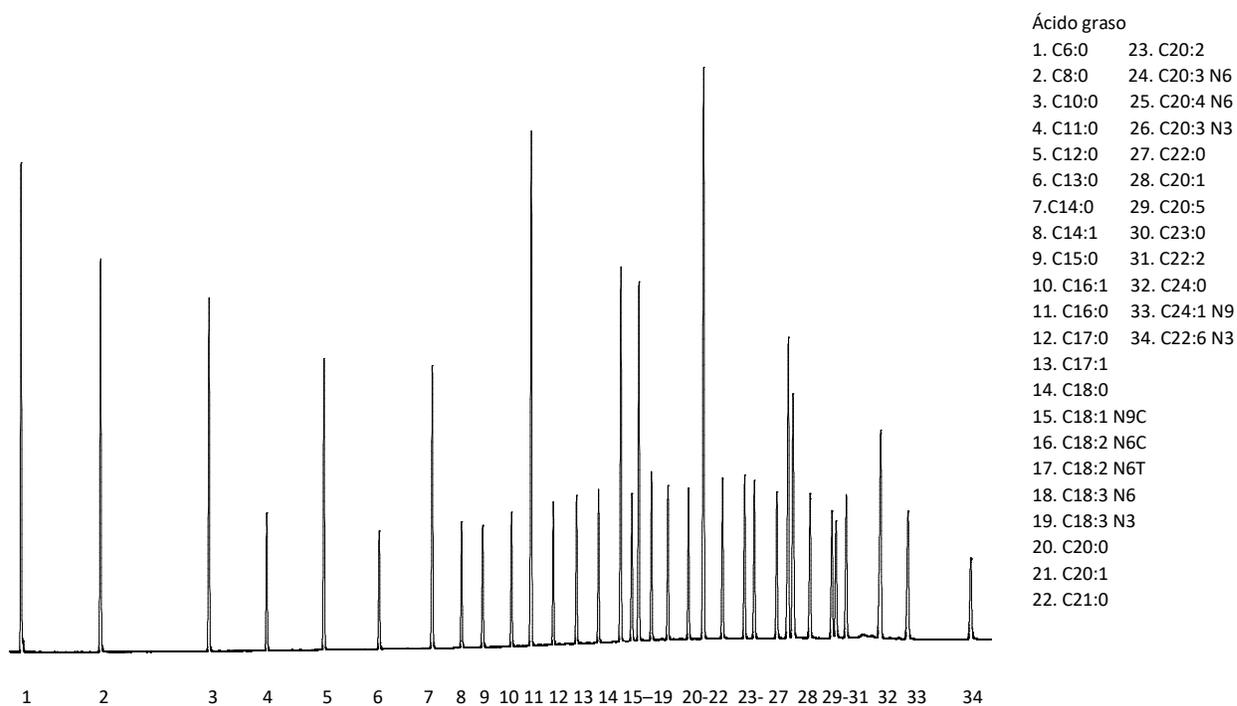
B) IR obtenido por Subhash *et al.* (2016)

Figura 5. Comparación de espectros IR: A) ácido púnico aislado del aceite extraído, B) ácido púnico aislado por Subhash *et al.* (2016)

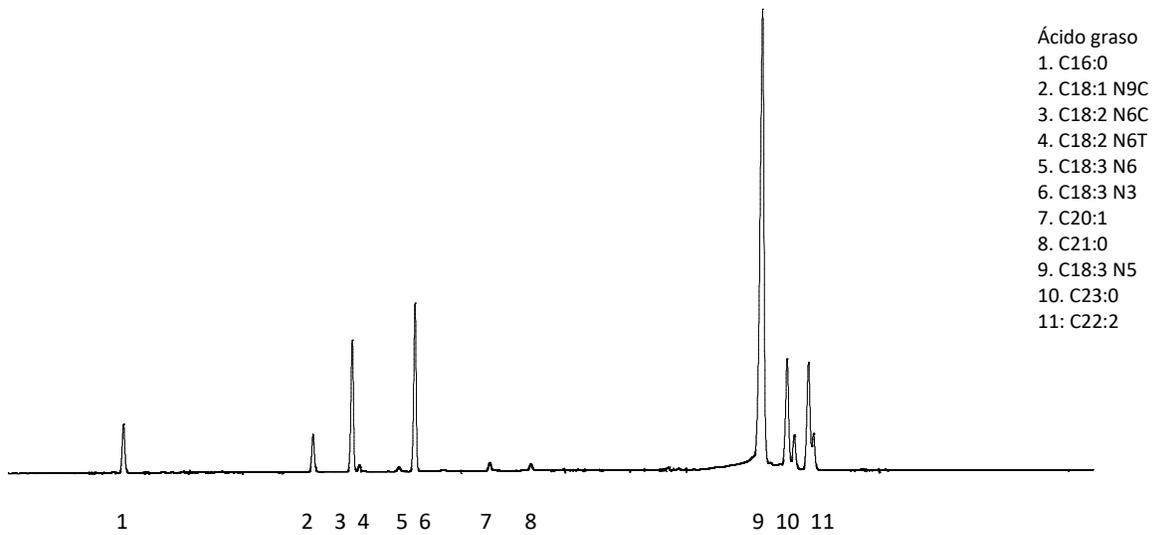
Cómo se muestra en la Figura 5, se realizó un IR-FT de la fracción correspondiente al ácido púnico donde se identificaron sus grupos funcionales y se comparó con un espectro de IR realizado por Subhash *et al.* (2016). En ambos espectros se

observaron bandas que corresponden a la presencia de un compuesto de cadena larga con insaturaciones y grupo carboxilo, los cuales son grupos característicos de un ácido graso. Además, de acuerdo con Siano *et al.* (2016) y Mahesar *et al.* (2019), los grupos funcionales característicos presentes en el aceite de semilla de granada se asemejan a otros aceites vegetales, excepto en la región de 1050-730 cm^{-1} ya que los isómeros de ácido graso CLA exhiben patrones típicos en el espectro del infrarrojo medio, produciendo una banda de absorción a 988 cm^{-1} o un doblete a 981 y 947 cm^{-1} , respectivamente. Dicho doblete se presentó en el IR del ácido punícico aislado, lo que confirmó la presencia del CLA o un isómero de este.

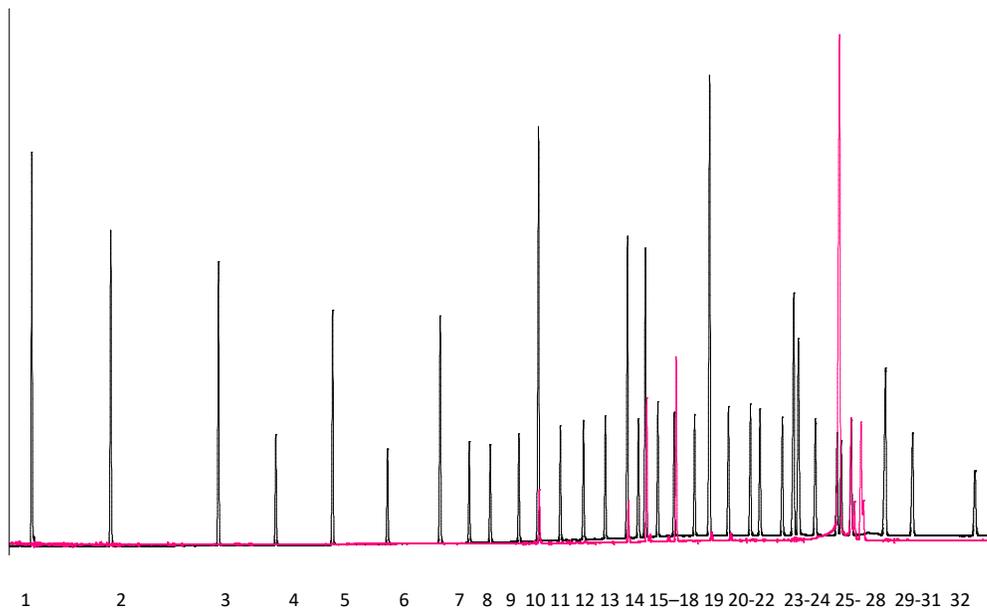
Una vez confirmada la presencia del ácido punícico (C18:3 N5) en las muestras de aceite de granada extraído para este trabajo, se procedió a la identificación y cuantificación de los ácidos grasos presentes mediante cromatografía de gases con detector de ionización de flama (GC-FID).



A) Cromatograma del estándar FAME Mix Supelco.



B) Cromatograma del aceite extraído (metilado a 80 °C)



Ácido graso								
1. C6:0	5. C12:0	9. C15:0	13. C17:1	17. C18:2 N6T	21. C20:1	25. C20:4 N6	29. C20:5	33. C24:1 N9
2. C8:0	6. C13:0	10. C16:1	14. C18:0	18. C18:3 N6	22. C21:0	26. C20:3 N3	30. C23:0	34. C22:6 N3
3. C10:0	7. C14:0	11. C16:0	15. C18:1 N9C	19. C18:3 N3	23. C20:2	27. C22:0	31. C22:2	
4. C11:0	8. C14:1	12. C17:0	16. C18:2 N6C	20. C20:0	24. C20:3 N6	28. C20:1	32. C24:0	

C) Cromatogramas A y B sobrepuestos

Figura 6. Cromatogramas de A) Estándar FAME MIX, Supelco; B) Aceite extraído; C) Cromatogramas A y B sobrepuestos.

Se inyectó el estándar FAME Mix-37 sin embargo, no contenía ácido punícico. Para identificar el tiempo de retención de este ácido graso se analizó de manera independiente, de acuerdo con la columna utilizada, el tiempo de retención del PUA coincidió con el tiempo de retención del ácido eicosapentaenoico (C20:5).

Como se muestra en la Figura 6, se identificaron 11 ácidos grasos en el B) aceite extraído, siendo mayoritario el ácido punícico (54.9%), seguido del α -linolénico (12.84%), tricosanoico (11.82%), docosadienoico (8.82%) y linoleico (4.40%). Estos ácidos grasos son poliinsaturados de cadena larga a excepción del ácido tricosanoico, un ácido graso saturado.

Tabla 2. Comparación de los perfiles de ácidos grasos en el aceite de granada extraído para este trabajo y otras variedades reportadas por Peng (2019).

<i>% Ácido graso (g AG /100 g semilla) \pm SD</i>	<i>Aceite de granada extraído</i>	<i>Aceite de granada Tunisia Soft Seed</i>	<i>Aceite de granada Taishanhong</i>
<i>Laúrico C12:0</i>		0.07	
<i>Palmitico C16:0</i>	3.50 \pm 0.10	4.10	6.12
<i>Heptadecanoico C17:0</i>		0.07	0.09
<i>Esteárico C18:0</i>		2.56	3.71
<i>Nonadecanoico C19:0</i>		1.01	
<i>Oleico C18:1 N9C</i>	2.42 \pm 0.09	4.95	6.69
<i>Linolelaidico C18:2 N6T</i>	0.40 \pm 0.02		
<i>Linoleico C18:2 N6C</i>	4.40 \pm 0.00	4.92	7.43
<i>γ-Linolénico C18:3 N6</i>	0.25 \pm 0.00		
<i>α-Linolénico C18:3 N3</i>	12.84 \pm 0.05		
<i>Araquidónico C20:0</i>		0.62	
<i>Eicosenoico C20:1</i>	0.17 \pm 0.01		1.32
<i>Heneicosenoico C21:0</i>	0.46 \pm 0.01		
<i>Tricosanoico C23:0</i>	11.82 \pm 0.19		
<i>Docosadienoico C22:2</i>	8.82 \pm 0.16		
<i>Docosatetraenoico C22:4</i>		0.11	
<i>Punícico C18:3 N5</i>	54.90 \pm 0.32	77.78	71.85
<i>PUFA</i>	81.62	83.01	79.32
<i>MUFA</i>	2.59	4.95	8.01
<i>SFA</i>	15.79	8.43	10.03

Se muestra el promedio de los triplicados \pm SD y coeficiente de variación menores al 5%.

Como se observa en la tabla 2, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, Polyunsaturated Fatty Acids) en el aceite extraído se mantuvieron entre los valores reportados por Peng (2019), siendo el ácido punícico la fuente mayoritaria. En las variedades *Taishanhong* y *Tunisia Soft Sweet* el porcentaje de PUA se reportó de 71.85 – 77.78 % en comparación con el aceite extraído con 54.90 % además, se detectó en el aceite extraído la presencia de un isómero, el ácido linolénico: 12.84 % como α y 0.25 % como γ .

El porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, Monounsaturated Fatty Acids) del aceite extraído fue bajo en comparación con las otras variedades, además se observó mayor porcentaje de ácido oleico en la variedad *Taishanhong* (6.69%) y en *Tunisia Soft Sweet* (4.95%).

La muestra con mayor contenido de ácidos grasos saturados (SFA, Saturated Fatty Acids) fue el aceite de granada extraído, donde se identificó el ácido tricosanoico (11.82%), un ácido graso de cadena larga que no se reportó en ninguna de las variedades estudiadas por Peng (2019).

Cabe resaltar que, el aceite extraído presentó porcentajes altos de ácidos grasos no detectados por otros autores, como el docosadienoico (8.82%), un ácido graso de cadena larga con doble insaturación que ejerce efecto inhibitorio sobre ADN polimerasa y ADN topoisomerasa, lo que implica su potencial aplicación como antitumoral (Chen *et al.*, 2021).

Paul & Radhakrishnan (2020) argumentaron que la composición de ácidos grasos en el aceite de granada dependía de la variedad. Aunque también influían otros factores como: condición ambiental, estado de maduración de la granada, método de extracción de los ácidos grasos y temperatura de metilación. De acuerdo con lo anterior, se decidió metilar el aceite extraído a 150°C durante 45 min para observar y comparar el perfil lipídico con una metilación realizada a 80°C.

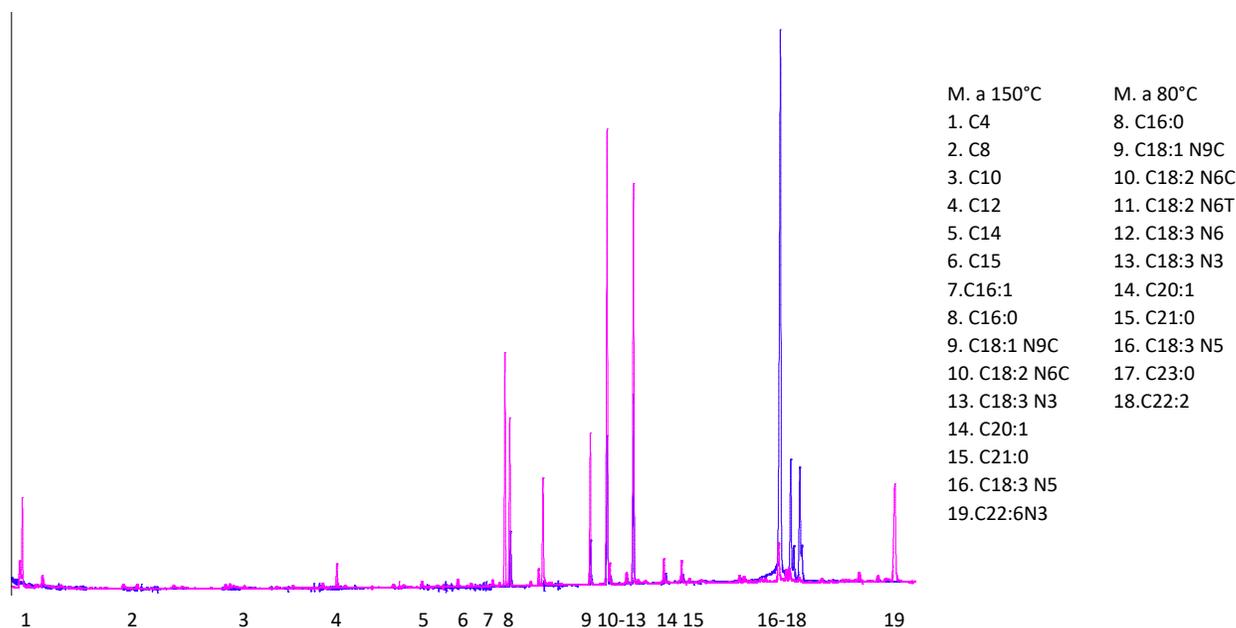


Figura 7. Comparación de metilación del aceite de granada extraído a 80°C (azul) vs. metilación a 150°C (rosa).

Como se aprecia en la Figura 7 al metilar a 150°C (durante 60 min) se observó mayor cantidad de ácidos grasos, siendo α -linolénico (25.66%) el mayoritario, seguido de palmitoleico (15.67%), linoleico (12.62%), docosahexaenoico (11.65%), palmítico (9.27%), oleico (7.80%), heptadecenoico (6.41%) y punícico (2.48%). Lo que sugiere que la metilación a esta temperatura propicia la isomerización del ácido punícico a α -linolénico, y favorece que una mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados se metilen (31.68%) en comparación con la metilación realizada a 80°C (2.59%). Además, se observó menor porcentaje de PUFA (53.1%) y la cantidad de SFA se mantuvo similar (15.18%).

En el año 2016 Siano *et al.*, sometieron al PSO a diferentes condiciones de metilación, simularon condiciones gástricas (pH=2.5, 37°C, 2 h), reportaron que el porcentaje de ácido punícico fue del 58.01% y concluyeron que CLnA era estable al “fluido gástrico simulado”.

Tomando en cuenta el perfil lípido del aceite de granada extraído, se decidió no aislar el ácido punícico y aprovechar todos los ácidos grasos mono y polinsaturados

presentes, además hay mayor estabilidad oxidativa cuando los ácidos grasos se encuentran en forma de triacilglicéridos que como ácidos grasos libres (Siano *et al.*, 2016) y se genera sinergia entre los ácidos grasos presentes.

3.3 Análisis composicional del bombón elaborado

Para la elaboración del producto, se buscó una matriz alimentaria que permitiera una mayor estabilidad del aceite, es decir, que fuera rica en compuestos como tocoferoles o compuestos fenólicos que actuaran como captadores de radicales, previniendo parte del daño oxidativo de las cadenas de acilo y que proporcionara otro tipo de componentes lipídicos (Siano *et al.*, 2016). Se eligió el chocolate amargo, por sus beneficios ya mencionados y para potencializar sus cualidades.

Para corroborar dicho efecto sobre las cualidades del chocolate, se realizó un análisis químico proximal (AQP) y se compararon dos muestras: bombón de chocolate suplementado con 1% de PSO y el chocolate amargo Callebaut-Sicao (utilizado para la elaboración del bombón).

Tabla 3. Comparación de Análisis Químico Proximal de diferentes chocolates.

	Bombón de chocolate con 1% PSO	Chocolate Callebaut- Sicao
<i>Humedad (%)</i>	6.61 ± 0.15 ^b	6.20 ± 0.09 ^a
<i>Cenizas (%)</i>	2.50 ± 0.02 ^a	2.81 ± 0.05 ^b
<i>Grasa (%)</i>	38.28 ± 0.40 ^a	33.37 ± 0.09 ^b
<i>Proteína (%)</i>	9.69 ± 0.02 ^a	9.65 ± 0.18 ^a
<i>Carbohidratos (%)</i>	*30.92 ± 0.13 ^a	*31.81 ± 0.13 ^b
<i>Fibra (%)</i>	13.48 ± 1.26 ^a	13.91 ± 1.16 ^a
<i>Energía en 100 g (Kcal)</i>	626.9 ± 0.01 ^a	481.0 ± 0.02 ^b

Se muestra el promedio de los triplicados ± SD y coeficiente de variación menores al 5%. Las letras a y b indican diferencia significativa.

Como se observa en la Tabla 3 no se encontró diferencia significativa en los porcentajes de proteína y fibra. El bombón de chocolate suplementado con 1% de

PSO presentó mayor porcentaje de humedad, grasa y aporte energético, sin embargo, su porcentaje de carbohidratos totales y cenizas fueron menores; por lo que se esperaría un menor porcentaje de sodio para esta muestra.

3.4 Análisis específicos

3.4.1 Sodio (Na)

Como se observa en la Tabla 4, el bombón de chocolate suplementado con 1% de PSO proporcionó 61.2% menos sodio en comparación con el chocolate Callebaut-Sicao, es decir, por cada 100 g de producto se tiene un aporte de 138.95 mg de sodio, lo que permite cumplir con la ingesta recomendada por la OMS (2020) de <2 g Sodio / día para disminuir la tensión arterial y el riesgo de enfermedades cardiovasculares. Cabe mencionar que el contenido de sodio encontrado en chocolate Callebaut-Sicao fue mayor al reportado en su etiquetado, lo cual podría deberse a que en sus ingredientes reportan que su elaboración es con un “álcali”, este tratamiento consiste en incorporar carbonatos ácidos o hidróxidos de sodio o potasio (principalmente) para aumentar el valor de pH y así obscurecer el cacao, suavizar su sabor e incrementar su solubilidad (Urbańska *et al.*, 2019).

Tabla 4. Comparación de análisis específicos.

	Bombón suplementado con 1% PSO	Chocolate Callebaut- Sicao
<i>Polifenoles totales (mg GAE /g muestra)</i>	31.09 ± 0.26	13.36± 0.16
<i>Sodio (mg/100 g muestra)</i>	138.95 ± 4.16	357.98 ± 5.55

Se muestra el promedio de los triplicados ± SD y coeficiente de variación menores al 5%.

3.4.2 Polifenoles Totales

Una investigación realizada por Miller *et al.* (2006), demostraron que la adición de un agente álcali influía no sólo en el aspecto antes mencionado, sino también en el contenido total de polifenoles del polvo de cacao, generando pérdidas de más del 60% del contenido total, debido a que se oxidaban y polimerizaban durante el proceso.

Urbańska *et al.* (2019) reportaron que, el chocolate con 70% de cacao contenía entre 22.41 a 27.46 mg ácido gálico (GAE) por gramo de chocolate. Mientras que Caponio *et al.* (2020) cuantificaron los polifenoles totales de un chocolate artesanal al 70% y uno comercial, encontraron que la cantidad de GAE por gramo de muestra fue de 20.66 y 21.53 mg respectivamente. Como se observa en la Tabla 4, el chocolate Callebaut-Sicao a pesar de ser un chocolate con 70% de cacao tuvo un valor bajo (13.36 mg/ g muestra) en comparación con lo reportado por Urbańska *et al.* (2019) o Caponio *et al.* (2020), lo que puede atribuirse al proceso de alcalinización.

Al realizar la inclusión del café arábigo (*Coffea arabica* L.) en la ganache para la elaboración del bombón, se compensó el contenido de polifenoles esperado en chocolates que no son sometidos a un proceso de alcalinización y como resultado, el producto elaborado contenía casi el doble de polifenoles totales (31.09 mg/ g muestra).

De acuerdo con la cuantificación de polifenoles totales realizado por Vega *et al.* (2017), el café arábigo contiene entre 28.60 - 46.82 mg GAE/ g, dependiendo de su grado de tostado, siendo polifenoles mayoritarios el ácido clorogénico, elálgico y cafeico (Suárez *et al.*, 2021). Mientras que el chocolate, es una fuente rica de polifenoles por la presencia del cacao que contiene flavonoides monoméricos como epicatequina y catequina, y flavonoides oligoméricos como las procianadinas (Beckett, 2008). Caponio *et al.* (2020), mencionan que además de estos compuestos se han detectado por espectrometría de masas quercetina y ácido clorogénico. Esto sugiere una posible sinergia entre los polifenoles del café con los del chocolate, dando como resultado un bombón de chocolate con mayor fuente de

polifenoles en comparación con otros chocolates amargos que contienen el mismo porcentaje de cacao.

3.4.3 Perfil de ácidos grasos

Se analizó el perfil de ácidos grasos para observar el efecto de la inclusión de 1% de aceite de semilla de granada.

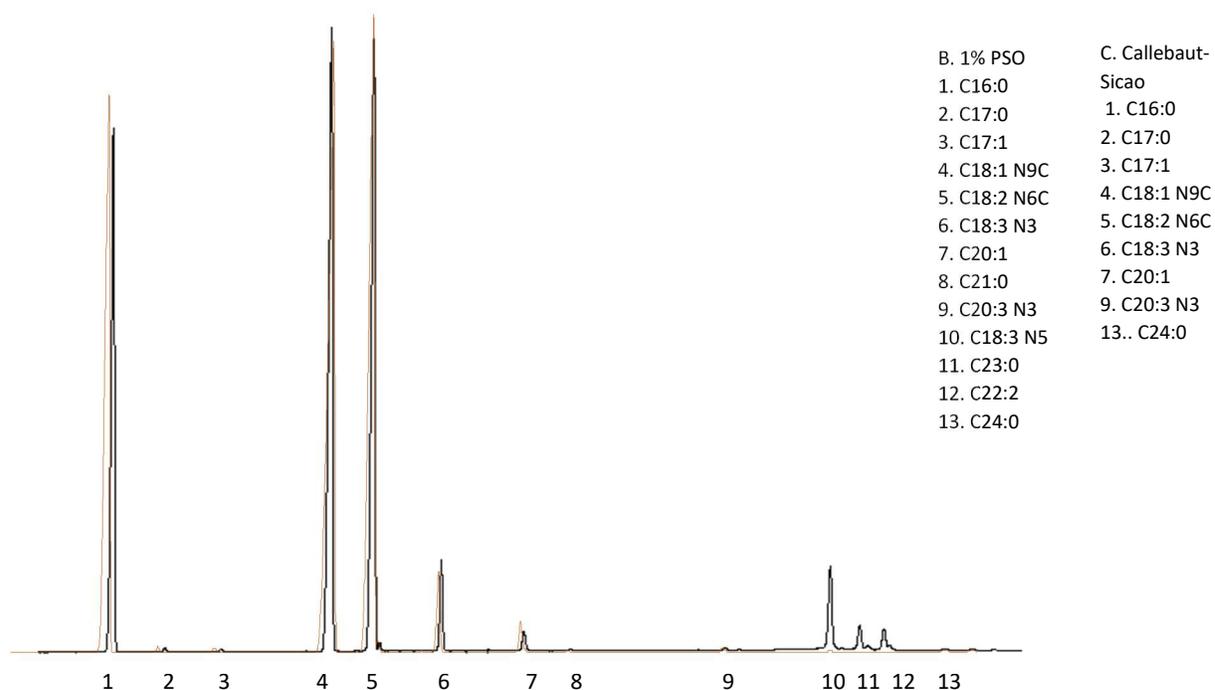


Figura 8. Comparación de los cromatogramas: bombón de chocolate suplementado con 1% de PSO (negro) y chocolate Callebaut-Sicao (rojo).

Como se aprecia en la Figura 8 se detectaron 4 ácidos grasos más en el bombón de chocolate suplementado con 1% de PSO, que correspondieron a los ácidos heneicosenoico (C21:0), tricosanoico (C23:0), docosadienoico (C22:2) y punícico (C18:3 N5).

Tabla 5. Perfil de ácidos grasos del bombón de chocolate suplementado con 1% de PSO y chocolate Callebaut-Sicao.

<i>% Ácido graso</i>	<i>Bombón de chocolate suplementado con 1% PSO</i>	<i>Chocolate Callebaut-Sicao</i>
<i>Palmitico C16:0</i>	29.03 ± 0.01 ^a	31.85 ± 0.13 ^b
<i>Heptadecanoico C17:0</i>	0.20 ± 0.00 ^a	0.14 ± 0.00 ^b
<i>Cis-10Heptadecenoico C17:1</i>	0.17 ± 0.00 ^a	0.15 ± 0.00 ^b
<i>Oleico C18:1 N9C</i>	39.19 ± 0.20 ^a	43.97 ± 0.06 ^b
<i>Linoleico C18:2 N6C</i>	18.32 ± 0.08 ^a	19.97 ± 0.07 ^b
<i>α-Linolénico C18:3 N3</i>	4.57 ± 0.03 ^a	3.45 ± 0.01 ^b
<i>Eicosenoico C20:1</i>	0.29 ± 0.00 ^a	0.30 ± 0.00 ^a
<i>Heneicosenoico C21:0</i>	0.08 ± 0.00	
<i>Eicosatrienoico C20:3 N3</i>	0.07 ± 0.00 ^a	0.07 ± 0.00 ^a
<i>Tricosanoico C23:0</i>	1.69 ± 0.04	
<i>Docosadienoico C22:2</i>	0.99 ± 0.00	
<i>Lignocerico C24:0</i>	0.10 ± 0.00 ^a	0.10 ± 0.00 ^a
<i>Punícico C18:3 N5</i>	5.29 ± 0.03	
<i>PUFA</i>	29.24	23.49
<i>MUFA</i>	39.6	44.42
<i>SFA</i>	31.10	32.09

Se muestra el promedio de los triplicados ± SD y coeficiente de variación menores al 5%. Las letras a y b indican diferencia significativa.

De acuerdo con la Tabla 5 el bombón de chocolate suplementado presentó 5.29% de ácido punícico, además se encontró ácido oleico (39.19%), palmítico (29.03%), linoleico (18.32%) y α-linolénico (4.57%), como ácidos grasos mayoritarios. De igual forma sucedió en el chocolate Callebaut-Sicao, predominó la presencia del ácido oleico (43.97%), seguido de palmítico (31.85%) y linoleico (19.97%) cuyos porcentajes fueron mayores a los encontrados en el bombón de chocolate suplementado con 1% de PSO.

Cabe destacar que la presencia del α -linolénico (3.45%) fue menor en chocolate Callebaut-Sicao, lo que indica que la inclusión de PSO enriqueció al bombón de chocolate elaborado con ácido punícico, α -linolénico, heneicosenoico, tricosanoico, docosadienoico y heptadecanoico, generando una mayor proporción de PUFA presente.

Considerado lo reportado por Chire (2009) se esperaba encontrar en un chocolate amargo (70% cacao) la presencia de ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linolénico y araquídico. Del cuál no se detectó la presencia del ácido esteárico ni araquídico, lo cual pudo deberse al tipo de grano de cacao y a los procesos durante su elaboración.

Tomando en cuenta que el PSO es una rica fuente de ácidos grasos insaturados y que su oxidación es preocupante en la industria alimentaria debido a que su rancidez puede generar derivados y productos tóxicos asociados (Siano *et al.*, 2016), se decidió realizar pruebas de estabilidad oxidativa.

3.5 Pruebas de estabilidad oxidativa

Adu-Frimpong *et al.* (2018) reportaron que la forma libre del ácido punícico se oxidaba rápidamente en 30 min a 50°C cuando se exponía al aire, lo que podría alterar su valor nutracéutico y funcional. Mientras que Siano *et al.* (2016), encontraron que cuando está unido a un triacilglicerol no se isomeriza de forma apreciable después de exponerlo al aire a 50° C durante un máximo de 120 min y no genera cambios significativos en el aceite.

Las pruebas de índice de acidez y de peróxidos se realizaron cada 15 días durante 3 meses, para monitorear la estabilidad del producto elaborado a dos temperaturas: refrigeración y ambiente.

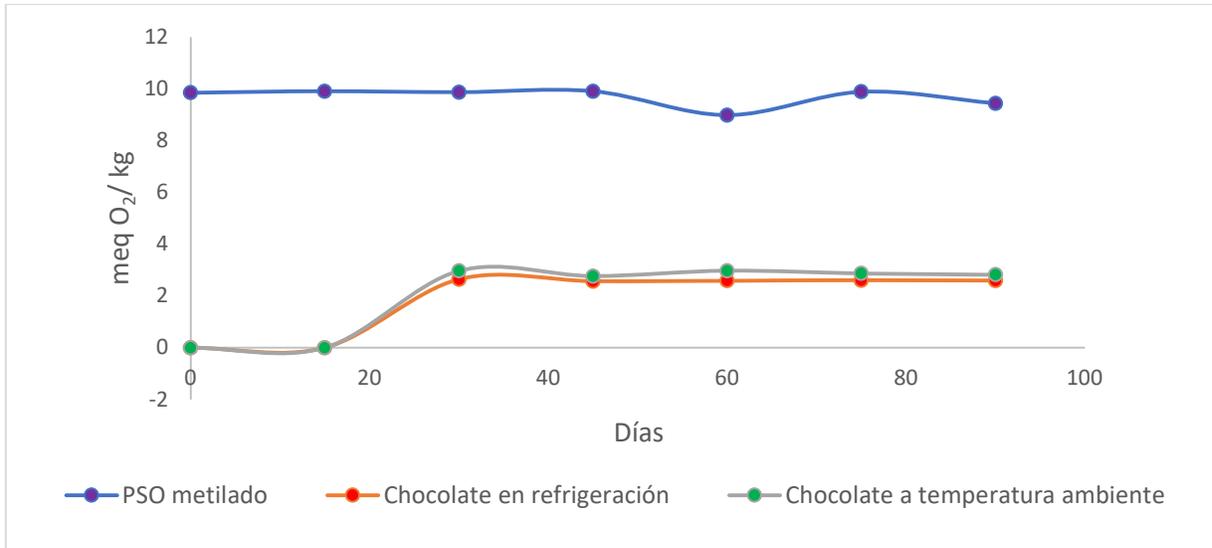


Gráfico 1. Índice de peróxido del aceite extraído y del bombón de chocolate suplementado con

De acuerdo con Drinić *et al.* (2020) el índice de peróxidos para el aceite de semilla de granada se mantenía en valores de 0.52 a 5.75 meq O₂ / kg, mientras que Ozcan (2009) señaló que valores superiores a 9 meq O₂ / kg indicaban la oxidación del aceite. Considerando lo anterior y observando los valores obtenidos para el aceite extraído se concluyó que el aceite estaba con un alto nivel de oxidación, pero al incluirlo en chocolate, independientemente de la temperatura de conservación, los niveles de peróxidos disminuyeron por la presencia de la manteca de cacao y se mantuvieron constantes durante 90 días.

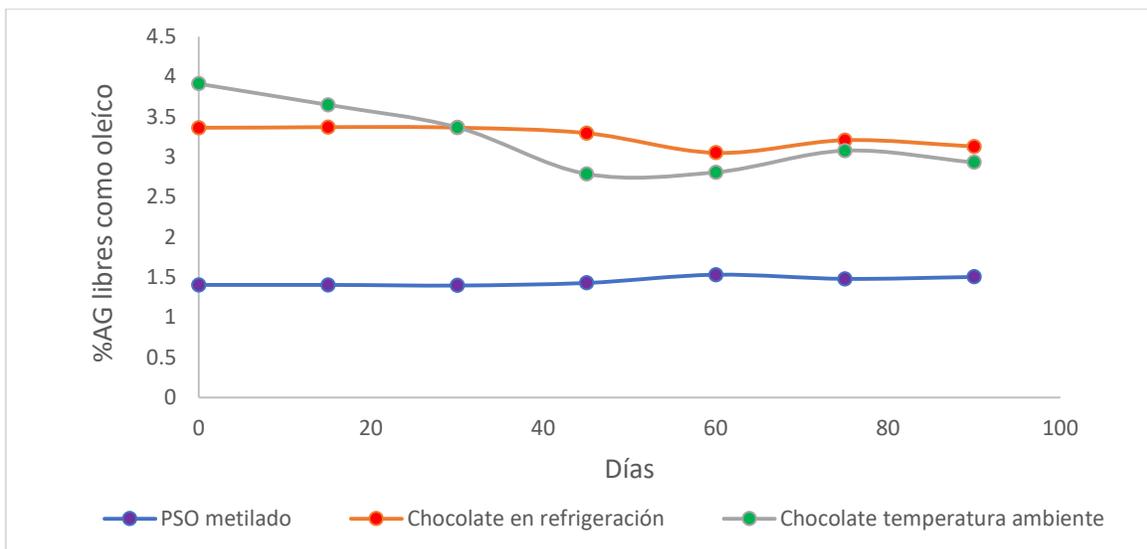


Gráfico 2. Índice acidez del aceite extraído y del bombón de chocolate suplementado con PSO.

Paul & Radhakrishnan (2020) reportan que los valores de acidez en PSO se encuentran entre 0.63-8.36 mg/ g, otros autores como Amri *et al.* (2017) determinaron valores de 1.69 mg/ g, significativamente menores a los resultados encontrados por Dadashi *et al.* (2013) en variedades de granadas iraníes (3.78 a 8.36 mg/ g). Como se observó en el Gráfico 2, el aceite tuvo valores constantes de 1.39-1.53 mg/ g, mientras que para el chocolate elaborado los valores fueron mayores, lo cual podría deberse a las condiciones de extracción de la grasa.

Amri *et al.* (2017) concluyeron que valores altos de acidez en PSO en comparación con los valores encontrados en otros aceites como el aceite de linaza y el aceite de girasol, indican que el PSO necesitaría refinarse para que sea adecuado para fines comestibles y sugieren que se producen algunas reacciones hidrolíticas durante la extracción.

3.6 Análisis Sensorial

Se evaluó el grado de aceptación por los consumidores del bombón de chocolate suplementado con PSO, por medio de un análisis sensorial que permitiera describir sus cualidades, así como su interés por este tipo de productos.

Se comparó el bombón de chocolate suplementado con 1% de PSO contra el bombón de chocolate control, elaborado de la misma forma sin la inclusión del aceite.

Se les preguntó a los consumidores acerca de su preferencia por el chocolate (frecuencia de consumo y tipo). Como se observa en el Gráfico 3, el 37% de los consumidores prefieren los chocolates con leche, y sólo un 4% trufas o chocolates rellenos, mencionaron que se debía a que no era fácil conseguir este tipo de productos a comparación de los chocolates con leche disponibles en tiendas de autoservicio o en la calle.

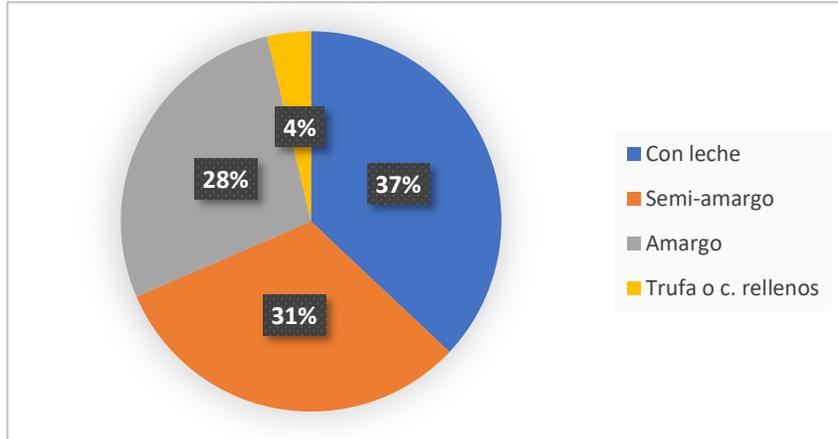


Gráfico 3. Preferencia del tipo de chocolate.

Así mismo, se les preguntó sobre la frecuencia con la que consumían chocolate, un 59% respondió que 1 vez a la semana. Lo cual se esperaba de acuerdo con lo reportado en el 2018 por el Gobierno de México, donde mencionan que el consumo de chocolate al año en México es de 700 g por persona, una cifra muy baja en comparación con los 11.9 kilos por persona que reportó Suiza en 2014, el mayor consumidor del mundo.

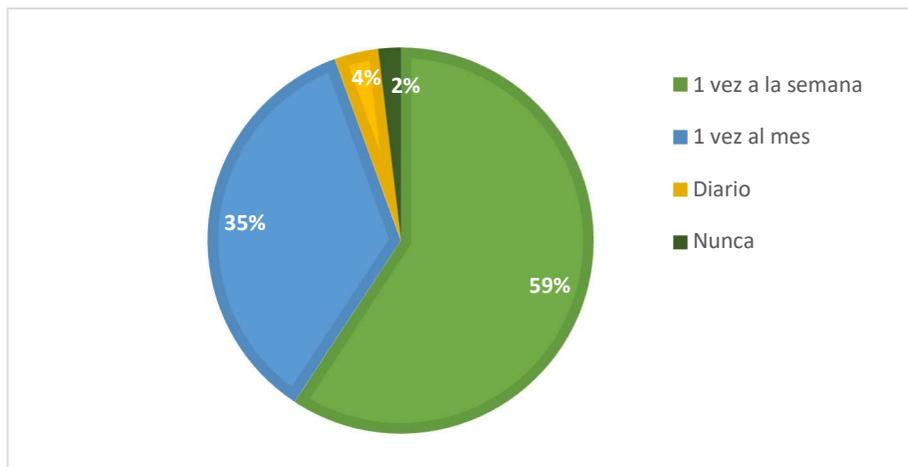


Gráfico 4. Frecuencia de consumo.

Al pedirles que evaluaran los atributos de dulzor, amargor y acidez (Gráfico 5) en cada bombón de chocolate, se encontró por medio de un análisis estadístico,

ANOVA, diferencia significativa en el atributo de acidez, lo cual podría deberse a que la inclusión del aceite potencializa la acidez del café en la ganache.

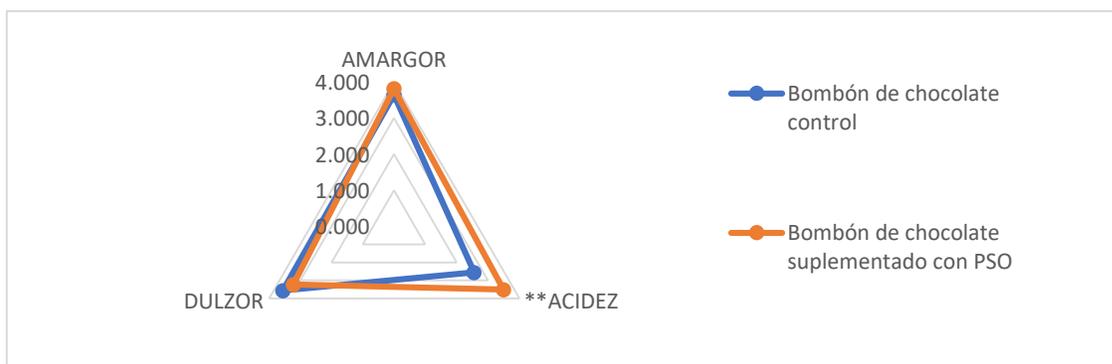


Gráfico 5. Comparación de atributos entre el bombón de chocolate suplementado y el bombón de chocolate control.

Se encontró que el 78% de los consumidores prefirieron el bombón de chocolate control. Además, como se muestra en el Gráfico 6, encontraron atributos pocos atractivos en el chocolate elaborado por la presencia del aceite, el cual le confirió sensación rancia (a pesar de no presentar rancidez en los estudios de estabilidad oxidativa realizados), sensación grasa, textura no deseable en el paladar y un olor no característico de un chocolate.

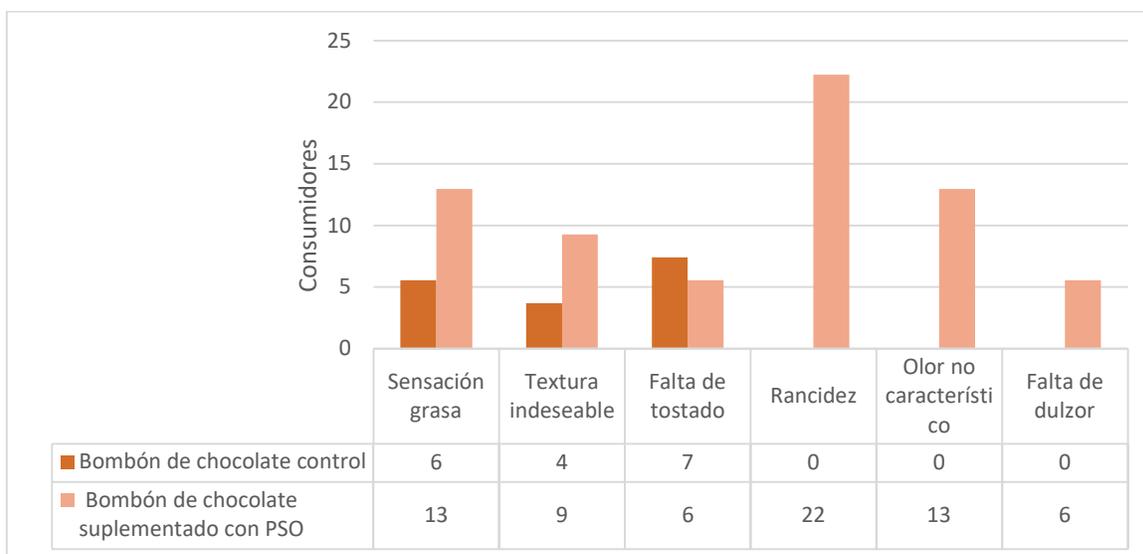


Gráfico 6. Características no deseables en los chocolates comparados.

Por último, también se observó que los consumidores detectaron sensación grasa, textura no deseable y falta de notas tostadas en el bombón de chocolate control a pesar de que este no contenía ninguna otra fuente externa de grasa a la que aporta el chocolate.

Al preguntarles si consumirían el producto elaborado sabiendo que le aportaría beneficios a la salud, el 98% contestó sí, el 2% que contestó no, argumentando que no consumen ni es de su agrado el chocolate.

CONCLUSIONES

Por medio de cromatografía en capa fina se aisló del aceite extraído el ácido puníco, con un factor de retención de 0.45 (de acuerdo con lo reportado en literatura).

La fracción aislada e identificada como ácido puníco se caracterizó por espectroscopia infrarroja. Se observaron bandas de absorción en 981 y 947 cm^{-1} , que confirmaron la presencia del ácido puníco.

El aceite extraído fue analizado mediante cromatografía de gases. El 81.62% de los ácidos grasos correspondieron a PUFA, lo cual concordó con lo reportado por diversos autores como Peng (2019) y Mahesar *et al.* (2019) que reportaron valores mínimos de 80%, y la predominancia de los ácidos grasos conjugados del ácido linolénico.

El ácido graso mayoritario identificado fue el ácido puníco (54.9%). Otros autores como Paul & Radhakrishnan (2020) reportan para este ácido graso porcentajes de 71.2–77.6% en variedades turcas. Esta variación se puede explicar con lo que mencionan estos autores, señalando que el perfil de ácidos grasos se ve afectado por distintos factores como condiciones geográficas, estado de maduración del fruto y la variedad.

Mediante un análisis estadístico se encontró diferencia significativa en los parámetros de humedad, cenizas, grasa, carbohidratos y energía bruta. El bombón

de chocolate suplementado con 1% de PSO presentó mayor porcentaje de humedad, grasa y aporte energético. Y menor contenido de carbohidratos totales y cenizas (a su vez menor cantidad de sodio). Debido a que es una matriz alimentaria más compleja al contener otros ingredientes como el aceite de granada, café y agua.

El bombón de chocolate suplementado con 1% de PSO resultó una fuente rica de polifenoles provenientes del cacao y del café presente en el gache, los cuales hicieron sinergia reflejando se en un mayor porcentaje en comparación con el chocolate Callebaut-Sicao. Esto sugiere que podrían ejercer un efecto antioxidante para el aceite de granada agregado.

El chocolate es considerado un alimento rico en grasas debido a la presencia de la manteca de cacao, este ingrediente facilitó la inclusión del aceite de granada.

La inclusión del aceite de granada al bombón de chocolate enriqueció el perfil de ácidos grasos con: ácido punícico, ácido α -linolénico, ácido heneicosenoico, ácido tricosanoico, ácido docosadienoico y ácido heptadecanoico, generando mayor proporción de PUFA presente.

Además, disminuyó el índice de peróxidos debido a que el aceite de granada estaba en una baja proporción en comparación con los otros ingredientes utilizados para la elaboración del bombón de chocolate.

Finalmente, el análisis sensorial mostró que la inclusión del aceite era perceptible y confería una sensación grasa y rancia en boca, además de un olor no propio a un chocolate. Sin embargo, los consumidores señalaron que consumirían el producto desarrollado debido a los efectos benéficos a la salud que les proporcionarían.

REFERENCIAS

- Abbasi, H., Karamatollah, R., & Rashidi, L. (2008). Extraction of Essential Oils From the Seeds of Pomegranate Using Organic Solvents and Supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85, 83–89. <https://doi.org/10.1007/s11746-007-1158-x>
- Adu-Frimpong, M., Omari-Siaw, E., Mukhtar, Y. M., Xu, X., & Yu, J. (2018). Formulation of Pomegranate Seed Oil: A Promising Approach of Improving Stability and Health-Promoting Properties. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(12), 1–11. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800177>
- Afoakwa, E. O. (2016). Chocolate Science and Technology: Second Edition. In *Chocolate Science and Technology: Second Edition (1st ed.)*. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118913758>
- Amri, Z., Lazreg-Aref, H., Mekni, M., El-Gharbi, S., Dabbaghi, O., Mechri, B., & Hammami, M. (2017). Oil characterization and lipids class composition of pomegranate seeds. *BioMed Research International*, 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/2037341>
- AOAC 920.75. (2005). Separation of Fat in Cacao Products. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.
- AOAC 931.04. (2008). Moisture in Cacao Products. Gravimetric Method. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.
- AOAC 963.15. (2006). Fat in Cacao Products. Soxhlet Extraction Method. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.
- AOAC 963.22. (2005). Methyl Esters of Fatty Acids in Oils and Fats. Gas Chromatographic Method. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.
- AOAC 969.33. (2005). Fatty Acids in Oils and Fats Preparation of Methyl Esters Boron Trifluoride Method. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.

- AOAC 972.15. (2002). Ash of cacao products. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.
- AOAC 985.35. (2005). Minerals in Infant Formula, Enteral Products and Pet Foods. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.
- AOAC 988.05. (2005). Protein (crude) in Animal Feed. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.
- AOAC 993.21. (2005). Total Dietary Fiber in foods and Foods products with <2% Starch. Non Enzymatic- Gravimetric Method. In *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, ING.
- Aruna, P., Venkataramanamma, D., Singh, A. K., & Singh, R. P. (2016). Health Benefits of Punicic Acid: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 16–27. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12171>
- ASTM. (1974). Standards for bomb calorimetry and combustion Methods. In *American Society for Testing and Materials*.
- Axayacatl, O. (2020). *Estadísticas de producción de granada en México*. Blog Agricultura. <https://blogagricultura.com/estadisticas-granada-mexico/>
- Axayacatl, O. (2022). *Estados productores de granada en México*. Blog Agricultura. <https://blogagricultura.com/estados-produccion-granada/>
- Banihani, S., Swedan, S., & Alguraan, Z. (2013). Pomegranate and type 2 diabetes. *Nutrition Research*, 33(5), 341–348. <https://doi.org/10.1016/J.NUTRES.2013.03.003>
- Bassaganya-Riera, J., Guri, A. & Hontecillas, R. (2011). Treatment of obesity-related complications with novel classes of naturally occurring PPAR agonists. *Journal of Obesity*, 2011, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2011/897894>
- Beckett, S. T. (2008). The Science of Chocolate. In *The Science of Chocolate* (Vol. 26, pp. 1–240). RSCPublishing. <https://doi.org/10.1093/labmed/26.2.152>

- Beckett, S. T. (2009). Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition. In *Industrial Chocolate Manufacture and Use: Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781444301588>
- Bhat, R., & Reddy, K. R. N. (2017). Challenges and issues concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: Updates from last decade. In *Food Chemistry* (Vol. 215, pp. 425–437). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.161>
- Białek, A., Stawarska, A., Bodecka, J., Białek, M., & Tokarz, A. (2017). Pomegranate seed oil influences the fatty acids profile and reduces the activity of desaturases in livers of Sprague-Dawley rats. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, 131, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2017.05.004>
- Boroshaki, M. T., Mollazadeh, H., & Afshari, A. R. (2016). Pomegranate seed oil: A comprehensive review on its therapeutic effects. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(2), 430–442. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(2\).430-42](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(2).430-42)
- Calín, A., & Carbonell, A. (2011). *La Fruta Granada Cultivada en España Punicalagina Antioxidante del Zumo de Granada y el Extracto de Granada en la Alimentación Funcional del Futuro*. (1st ed.). GRANATUM PLUS. <https://studylib.es/doc/5982527/la-fruta-granada-cultivada-en-espana>
- Campos, I., Hernández, L., Oviedo, C., & Barquera, S. (2022). Sobrepeso y obesidad e hipertensión arterial en adultos. In *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2021 sobre Covid-19*. Resultados nacionales. (pp. 265–320). © Instituto Nacional de Salud Pública. https://www.insp.mx/resources/images/stories/2022/docs/220801_Ensa21_digital_29julio.pdf
- Caponio, G. R., Lorusso, M. P., Sorrenti, G. T., Marcotrigiano, V., Difonzo, G., De Angelis, E., Guagnano, R., Di Ciaula, A., Diella, G., Logrieco, A. F., Montagna, M. T., Monaci, L., De Angelis, M., & Portincasa, P. (2020). Chemical Characterization, Gastrointestinal Motility and Sensory Evaluation of Dark

- Chocolate: A Nutraceutical Boosting Consumers' Health. *Nutrients*, 12(939), 1–20. <https://doi.org/10.3390/nu12040939>
- Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., & Mitchell, J. B. (1987). Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay : Assessment of Radiosensitivity. *Cancer Research*, 47(4), 943–946.
- Chen, Y., Qiu, X., & Yang, J. (2021). Comparing the In Vitro Antitumor , Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities between Two New Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids , Docosadienoic Acid (DDA) and Docosatrienoic Acid (DTA), and Docosahexaenoic Acid (DHA) Comparing the In Vit. *Nutrition and Cancer*, 73(9), 1697–1707. <https://doi.org/10.1080/01635581.2020.1804949>
- Chire, G. C. (2019). *Mejora de propiedades físicas y su efecto en el contenido de ácidos grasos en chocolate peruano aplicando superficie de respuesta*. [Universidad Nacional Agraria la Molina]. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4098/chire-fajardo-gabriela-cristina.pdf?sequence=4&isAllowed=y>
- Crowe, T. D., & White, P. J. (2001). Adaptation of the AOCS Official Method for Measuring Hydroperoxides from Small-Scale Oil Samples. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(12), 1267–1269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11745-001-0424-7>
- Dadashi, S., Mousazadeh, M., Emam-Djomeh, Z., & Mohammad, S. (2013). Pomegranate (*Punica granatum* L.) seed: A comparative study on biochemical composition and oil physicochemical characteristics Biochemical composition of pomegranate seed oil. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 1(4), 2322–4827. <http://www.ijabbr.com>
- De Filippo, G. (2021). Obesidad y síndrome metabólico. *EMC - Pediatría*, 56(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/s1245-1789\(21\)44717-7](https://doi.org/10.1016/s1245-1789(21)44717-7)
- Drinić, Z., Mudrić, J., Zdunić, G., Bigović, D., Menković, N., & Šavikin, K. (2020). Effect of pomegranate peel extract on the oxidative stability of pomegranate

seed oil. *Food Chemistry*, 333, 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127501>

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

Fadavi, A., Barzegar, M., & Hossein Azizi, M. (2006). Determination of fatty acids and total lipid content in oilseed of 25 pomegranates varieties grown in Iran. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6), 676–680. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.09.002>

Faghihimani, Z., Mirmiran, P., Sohrab, G., Iraj, B., & Faghihimani, E. (2016). Effects of pomegranate seed oil on metabolic state of patients with type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Preventive Medicine*, 7(124), 1–6. <https://doi.org/10.4103/2008-7802.194883>

Gobierno de México. (2013). *Foro Regional sobre el cultivo y utilización de la granada roja*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. <https://www.gob.mx/inifap/prensa/foro-regional-sobre-el-cultivo-y-utilizacion-de-la-granada-roja>

Gobierno de México. (2018). El chocolate, alimento de los dioses. *Procuraduría Federal Del Consumidor*. <https://www.gob.mx/profeco/documentos/el-chocolate-alimento-de-los-dioses?state=published>

Gobierno de México. (2020). Granada: Sabor y salud en cada fruta. *Blog Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural*. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/granda-sabor-y-salud-en-cada-fruta?idiom=es>

Gómez, M., González, L., Bravo, L., Vaquero, M., Bastida, S., & Sánchez, F. (2011). Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 26(2), 289–292. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.2.5016>

González, I., Solano, D., Porcu, P., Ruiu, A., Rojas, Y., & Rivera, E. (2019).

Optimized synthesis , characterization and in vitro systematic evaluation of adamantane-doxorubicin prodrugs sensitive to pH in breast cancer cells. *Journal of Molecular Structure*, 1177, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.09.044>

Hiwale, S. (2009). *The pomegranate*. New India Publishing Agency.

Holic, R., Xu, Y., Caldo, K. M. P., Singer, S. D., Field, C. J., Weselake, R. J., & Chen, G. (2018). Bioactivity and biotechnological production of punicic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3537–3549. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8883-y>

Holland, D., & Bar-Ya'akov, I. (2018). Pomegranate (*Punica Granatum* L.) Breeding. In J. M. Al-Khayri, D. V. Johnson, & S. Mohan (Eds.), *Advances in Plant Breeding Strategies: Fruits* (1st ed., Vol. 3, pp. 601–647). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-23108-8>

Holland, D., Hatib, K., & Bar-ya'akov, I. (2009). Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. In J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews* (1st ed., Vol. 35, pp. 127–192). Wiley-Blackwel.

Hou, C., Zhang, W., Li, J., Du, L., Lv, O., Zhao, S., & Li, J. (2019). Beneficial Effects of Pomegranate on Lipid Metabolism in Metabolic Disorders. *Molecular Nutrition and Food Research*, 63(16), 1–12. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800773>

INEGI. (2021). *Estadísticas a propósito del día mundial de la diabetes*. COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 645/21. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/EAP_Diabetes2021.pdf

Khajebishak, Y., Payahoo, L., Alivand, M., Hamishehkar, H., Mobasser, M., Ebrahimzadeh, V., Alipour, M., & Alipour, B. (2019). Effect of pomegranate seed oil supplementation on the GLUT-4 gene expression and glycemic control in obese people with type 2 diabetes: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), 19621–19628.

<https://doi.org/10.1002/jcp.28561>

- Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 177–206. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.09.006>
- Levin, G. (2006). *Pomegranate Roads: A Soviet Botanist's Exile from Eden* (Illustrada). Floreat Press.
- Linnaeus, C. (1753). *Species plantarum: exhibentes plantas rite cognitatas ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus.*: Vol. Tomo 1 (1908th ed.). Laurentii Salvii. <https://doi.org/https://doi.org/10.5962/bhl.title.37656>
- López, C. M., Maselli, M. E., Di Milta, N., Recalde, G. M., Vanrell, M. C., Uvilla, A., Messina, D., Pérez, R. F., & López, J. D. (2009). Influence of leptin and adiponectin on prostate cancer. *Archivos Espanoles de Urologia*, 62(2), 103–108.
- Mahesar, S. A., Kori, A. H., Hussain, S. T., Kandhro, A. H., & Laghari, Z. H. (2019). Pomegranate (Punica granatum) Seed Oil. In M. Fawzy (Ed.), *Fruit Oils: Chemistry and Functionality* (1st ed., pp. 691–710). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-12473-1_16
- Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12), 3444–3452. <https://doi.org/10.1021/jf011440s>
- McFarlin, B. K., Strohacker, K. A., & Kueht, M. L. (2009). Pomegranate seed oil consumption during a period of high-fat feeding reduces weight gain and reduces type 2 diabetes risk in CD-1 mice. *British Journal of Nutrition*, 102(1), 54–59. <https://doi.org/10.1017/S0007114508159001>
- Meerts, I. A. T. M., Verspeek-Rip, C. M., Buskens, C. A. F., Keizer, H. G., Bassaganya-Riera, J., Jouni, Z. E., van Huygevoort, A. H. B. M., van Otterdijk,

- F. M., & van de Waart, E. J. (2009). Toxicological evaluation of pomegranate seed oil. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1085–1092. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2009.01.031>
- Melgarejo, P., Núñez-Gómez, D., Legua, P., Martínez-Nicolás, J. J., & Almansa, M. S. (2020). Pomegranate (*Punica granatum* L.) a dry pericarp fruit with fleshy seeds. *Trends in Food Science & Technology*, 102, 232–236. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.02.014>
- Miguel-Soca, P. E. (2009). Dislipidemias. In *ACIMED* (Vol. 20, Issue 6). Centro Nacional de Informacion de Ciencias Medicas. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352009001200012&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Miller, K., Stuart, D., Smith, N., Lee, C., Mchale, N., Flanagan, J., Ou, B., & Hurst, J. (2006). Antioxidant Activity and Polyphenol and Procyanidin Contents of Selected Commercially Available Cocoa-Containing and Chocolate Products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 4062–4068. <https://doi.org/10.1021/jf060290o>
- Miranda, J., Aguirre, L., Fernández-Quintela, A., MacArulla, M. T., Martínez-Castaño, M. G., Ayo, J., Bilbao, E., & Portillo, M. P. (2013). Effects of pomegranate seed oil on glucose and lipid metabolism-related organs in rats fed an obesogenic diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5089–5096. <https://doi.org/10.1021/jf305076v>
- Mirmiran, P., Fazeli, M. R., Asghari, G., Shafiee, A., & Azizi, F. (2010). Effect of pomegranate seed oil on hyperlipidaemic subjects: A double-blind placebo-controlled clinical trial. *British Journal of Nutrition*, 104(3), 402–406. <https://doi.org/10.1017/S0007114510000504>
- Mirza, A. Z., Althagafi, I. I., & Shamshad, H. (2019). Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 166, pp. 502–513). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.01.067>

NMX-F-101-SCFI-2012. (n.d.). *Alimentos- Aceites y grasas vegetales o animales- Determinación de ácidos grasos libres- Método de prueba*. Diario Oficial de la Federación.

https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5268346&fecha=17/09/2012#gsc.tab=0

NMX-F-154-SCFI-2010. (n.d.). *Alimentos- Aceites y grasas vegetales o animales- Determinación del valor de peróxidos- Método de prueba*. Diario Oficial de la Federación.

https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5157991&fecha=06/09/2010#gsc.tab=0

NOM-186-SSA1/SCFI-2013. (n.d.). *Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba*. Diario Oficial de la Federación. https://www.e-casa.com.mx/dof/2014/mar/28032014_nom-186-ssa1-scfi-2013.pdf

OMS. (2020). *Reducir consumo de sal*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>

OMS. (2022a). *Diabetes*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

OMS. (2022b). *Hipertensión*. Organización Mundial de La Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hypertension>

ONU. (2022). *Grano a grano, la granada se abre camino entre las frutas*. Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2022/03/1504792>

Ozcan, M. M. (2009). Some nutritional characteristics of fruit and oil of walnut (*Juglans regia* L.) growing in Turkey. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 28(1), 57–62.

Parashar, A. (2010). Lipid content and fatty acid composition of seed oils from six pomegranate cultivars. *International Journal of Fruit Science*, 10(4), 425–430. <https://doi.org/10.1080/15538362.2010.530129>

- Paul, A., & Radhakrishnan, M. (2020). Pomegranate seed oil in food industry: Extraction, characterization, and applications. *Trends in Food Science and Technology*, *105*, 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.014>
- Peng, Y. (2019). Comparative analysis of the biological components of pomegranate seed from different cultivars. *International Journal of Food Properties*, *22*(1), 784–794. <https://doi.org/10.1080/10942912.2019.1609028>
- SECTEI. (2020). *Secretaría de Educación, Ciencia, Tecnología e Innovación*. En El País, 75 de Cada 100 Mexicanos Tiene Sobrepeso u Obesidad. <https://sectei.cdmx.gob.mx/comunicacion/nota/en-el-pais-75-de-cada-100-mexicanos-tienen-sobrepeso-u-obesidad#:~:text=En México%2C la mitad de,y enfermedades cardiovasculares%2C las causantes>
- Siano, F., Addeo, F., Volpe, M. G., Paolucci, M., & Picariello, G. (2016). Oxidative Stability of Pomegranate (*Punica granatum* L.) Seed Oil to Simulated Gastric Conditions and Thermal Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(44), 8369–8378. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04611>
- Sita Devi, P. (2003). TLC as a tool for quantitative isolation of conjugated trienoic FA. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *80*(4), 315–318. <https://doi.org/10.1007/s11746-003-0696-y>
- Stover, E., & Mercure, E. W. (2007). The pomegranate: A new look at the fruit of paradise. *HortScience*, *42*(5), 1088–1092. <https://doi.org/10.21273/hortsci.42.5.1088>
- Suárez, S., Alfaro, E., & Ramírez, E. (2021). Actividad antioxidante, polifenoles y flavonoides de *Coffea arabica* de cinco regiones peruanas. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, *86*(4), 343–354. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i4.307>
- Subhash, R., Ramesh, A., Jaysingrao, A., & Gopal, M. (2016). Isolation of punicic acid from pomegranate seed oil, its characterization and evaluation for antithrombotic activity. *International Journal of Advanced Research*, *4*(12), 2493–2498. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/2674>

- Urbańska, B., Derewiaka, D., Lenart, A., & Kowalska, J. (2019). Changes in the composition and content of polyphenols in chocolate resulting from pre-treatment method of cocoa beans and technological process. *European Food Research and Technology*, 245(10), 2101–2112. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03333-w>
- Urbańska, B., & Kowalska, J. (2019). Comparison of the Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Chocolate Obtained from Roasted and Unroasted Cocoa Beans from Different Regions of the World. *Antioxidants (Basel)*, 8(283), 1–13. <https://doi.org/10.3390/antiox8080283>
- Vega, A., De León, J. A., & Reyes, S. M. (2017). Determinación del Contenido de Polifenoles Totales, Flavonoides y Actividad Antioxidante de 34 Cafés Comerciales de Panamá. *Informacion Tecnologica*, 28(4), 29–38. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000400005>
- Yuan, G., Sinclair, A. J., Xu, C., & Li, D. (2009). Incorporation and metabolism of puniic acid in healthy young humans. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(10), 1336–1342. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200800520>
- Yuan, G., Chen, X., & Li, D. (2015). Modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) by conjugated fatty acid in obesity and inflammatory bowel disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(7), 1883–1895. <https://doi.org/10.1021/jf505050c>

APÉNDICE

Determinación de inhibición de viabilidad por reducción de MTT.

Los efectos de los extractos de semilla de granada y sus derivados en las líneas celulares VERO, LLC-PK1, ACHN y 786-0 fueron analizados mediante el ensayo de MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico), primero a través de un análisis exploratorio simple en las cuatro líneas celulares, y posteriormente en tres experimentos independientes en las líneas celulares VERO y ACHN, basándose en la descripción modificada de Carmichael *et al.* (1987) y González *et al.* (2019), se emplearon de la siguiente manera: cada cultivo de las líneas celulares se incubaron en placas de 96 pozos con un número inicial de 7,000 células por pozo en un volumen de 200 μ L de medio de cultivo D-MEM (Minimum Essential Media, modificado por Dulbecco, Invitrogen Carlsbad C.A USA). Después de 24 h de incubación, los cultivos fueron tratados con soluciones de diferentes concentraciones, cada uno a un volumen de 50 μ L (stocks) de los extractos de semilla de granada y de la fracción correspondiente al ácido punícico, de tal manera que en cada uno de los pozos con un volumen final de 250 μ L. Se tuvieron concentraciones finales de 0.00617, 0.0185, 0.055, 0.16 y 0.5 mg/mL para el análisis exploratorio de estos extractos y de 0.25, 0.375, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/mL para cada uno de los tres experimentos independientes. Al final de 48 h de exposición a los extractos, a las células se les determinó la viabilidad celular añadiendo a cada uno de los pozos 20 μ L de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) y se incubaron las placas durante 4 h adicionales, después todo el contenido del pozo fue decantado y el precipitado formado por la reducción del MTT fue disuelto con 250 μ L de dimetilsufoxido (DMSO). La absorbancia de la solución colorida formada fue detectada a 540 nm en un lector de placas (Molecular devices, Sunnyvale, CA USA), donde la viabilidad en cada pozo fue directamente proporcional al desarrollo de color. El 100% de viabilidad corresponde a los pozos en donde no se adicionaron los extractos, es decir a los controles negativos (los cuales resultaron similares a los pozos a los cuales se les adiciono únicamente el vehículo en este caso DMSO). Con los resultados obtenidos se graficó el porcentaje

de inhibición de la viabilidad celular, con respecto a la concentración del extracto para observar su tendencia y determinar su grado de inhibición.

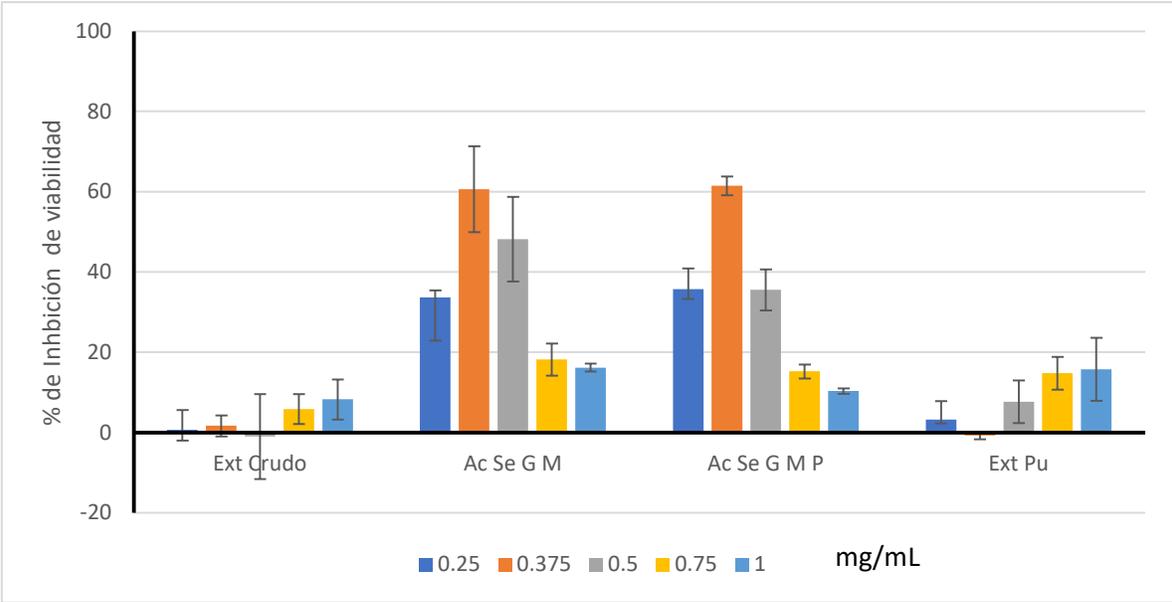


Gráfico 7. Ensayo de citotoxicidad en células ACHN.

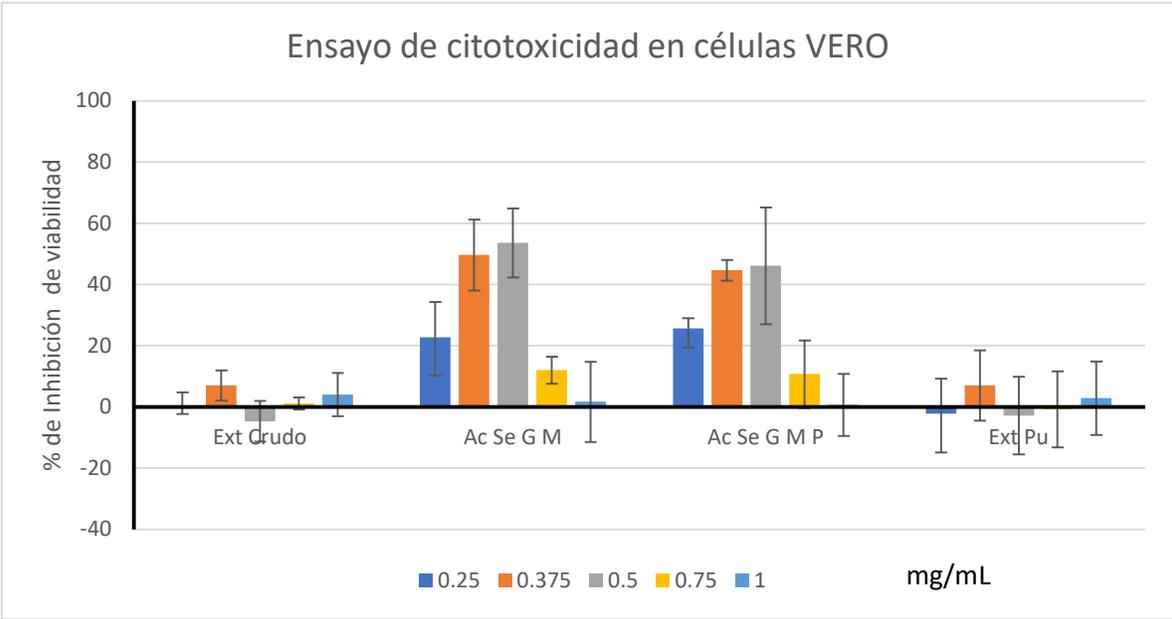


Gráfico 8. Ensayo de citotoxicidad en células VERO.

Los resultados mostraron la probable actividad inhibitoria o citotóxica de los extractos de semilla de granada, ya que los compuestos que se esperan caracterizar son similares a los que ya tienen actividad de este tipo, se diseñó una estrategia preliminar de análisis exploratorio para observar la potencia de estos extractos con ensayos de MTT, así a partir de una solución de stock de trabajo de 1 microgramo por microlitro de cada uno de los extractos se probó un rango de concentraciones de 0.00617, 0.0185, 0.055, 0.16 y 0.5 mg / mL. Los resultados mostraron que a estas concentraciones no se observa actividad inhibitoria o citotóxica, se observa una actividad que no aumenta más allá de 20% de inhibición, por lo que se decidió realizar un análisis utilizando un intervalo de mayor concentración de 0.25, 0.375, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/ mL. Con estos valores se apreció que a concentraciones de 0.25, 0.375 y de 0.5 solo en los extractos metilados (aceite de semilla de granada metilada y ácido punícico) se tuvo una actividad inhibitoria importante que alcanzó más del 50% de inhibición. A dosis más elevadas de 0.75 y de 1.0 mg/ mL esta actividad disminuyó, por lo que se puede pensar que se trata de compuestos con actividad citotóxica a bajas concentraciones, pero a altas concentraciones podrían promover la proliferación celular. Sin embargo, para interpretar estos resultados se requiere de una mayor discusión acerca de la naturaleza de los componentes y el proceso de aislamiento de estos extractos, para poder proponer una hipótesis de este comportamiento y un diseño de experimentación de evaluación biológica más amplia.

PROSPECTIVAS

- Realizar un análisis de vida de anaquel para evaluar la estabilidad del producto terminado, así como la posible migración del aceite incluido en el relleno.
- Realizar un estudio bioquímico en ratones inducidos a obesidad contra ratones sanos, para valorar el efecto de la suplementación de PSO extraído en su dieta mediante la evaluación de la expresión de PPAR- γ en hígado y tejido adiposo, además de medir niveles de glucosa, insulina, triacilglicéridos y colesterol en suero.
- Realizar un estudio en personas sanas mediante la ingesta diaria del chocolate elaborado, evaluando cada semana los niveles de glucosa, insulina, triacilglicéridos y colesterol en sangre cada semana. Para determinar la dosis promedio adecuada en la cual se puedan observar los efectos benéficos a la salud.
- Realizar un estudio más amplio sobre la actividad inhibitoria o citotóxica tanto del aceite de semilla de granada como el ácido punícico extraído de diferentes variedades de granada para observar si el proceso de aislamiento y el porcentaje de PUA influye en su actividad citotóxica.