

Evaluación de metabolitos de interés en barra de chocolate (*Theobroma cacao*) adicionada con jengibre

Y.I.S. López-Haro¹, R. Cruz-Muñoz^{1,2}, T.J. Ariza-Ortega¹ y N.R. Román-Cortés*¹

1 Universidad Politécnica del Valle de México, División de Ingeniería en Nanotecnología, Laboratorio de Tecnología de Alimentos, Av. Mexiquense s/n esquina Av. Universidad Politécnica, Col. Villa Esmeralda, C.P. 54910, Tultitlán, Estado de México, México. **2** Universidad Mexiquense del Bicentenario, Unidad de Estudios Superiores Tultitlán, Laboratorio de Investigación, San Antonio s/n, Villa Esmeralda, 54910 Tultitlán de Mariano Escobedo, Estado de México, México. *romco_dsr@hotmail.com

RESUMEN

La elevada prevalencia de sobrepeso y obesidad y algunas enfermedades derivadas de éstas como la diabetes presentes en la población, son resultado de un ambiente obesogénico, por lo que es necesario la implementación de alimentos nutraceuticos. En las últimas décadas se han realizado estudios de los productos obtenidos del grano del cacao que han demostrado que aportan energía y son ricos en antioxidantes y poseen propiedades antiinflamatorias debido a su contenido de flavonoides; de la misma forma que estudios acerca del jengibre han demostrado que contiene gingerol, compuesto responsable de los efectos antiinflamatorios, antimicrobianos, hipoglucémicos anticancerígenos, antioxidantes y desintoxicantes de este alimento. Este proyecto planteó el objetivo de evaluar el contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas de barras de chocolate adicionadas con jengibre con y sin azúcar, como una propuesta de alimento funcional dirigido a la población anteriormente mencionada. Para ello se realizaron barras de chocolate con jengibre en diferentes concentraciones, de ellas se obtuvieron extractos metanólicos con la finalidad de cuantificar mediante métodos estandarizados la cantidad de metabolitos de interés; resultando que las muestras contienen hasta: 1.390 ± 0.127 mg $100g^{-1}$ p.f. de antocianinas, 50.969 ± 0.876 mg $100g^{-1}$ p.f. y 623.492 ± 4.832 mg $100g^{-1}$ p.f. de fenoles.

Palabras clave: Cacao, jengibre, chocolate, antocianinas, flavonoides, fenoles.

ABSTRACT

The overweight and obesity prevalence and some common diseases derived such as diabetes present in the population, are the result of an obesogenic environment, for which the implementation of nutraceutical foods is necessary. In the last decades, studies have been carried out on the products obtained from the cocoa bean, which have shown that they provide energy and are rich in antioxidants and have anti-inflammatory properties due to their flavonoid content; in the same way, that studies on ginger have shown that it contains gingerol, a compound responsible for the anti-inflammatory, antimicrobial, hypoglycemic, anticancer, antioxidant and detoxifying effects of this food. This project raised the objective of evaluating the content of phenols, flavonoids and anthocyanins of chocolate bars added with ginger with and without sugar, as a functional food proposal aimed at the aforementioned population. For this, chocolate bars with ginger were made in different concentrations, from which methanolic extracts were obtained in order to quantify the amount of metabolites of interest by means of standardized methods; resulting in samples containing up to: 1.390 ± 0.127 mg $100g^{-1}$ f.w. of anthocyanins, 50.969 ± 0.876 mg $100g^{-1}$ f.w. and 623.492 ± 4.832 mg $100g^{-1}$ f.w. of phenols.

Keywords: Cocoa, ginger, chocolate, flavonoids, phenols, anthocyanins.

INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años, México ha incrementado la producción del cacao, siendo Chiapas y Tabasco los principales productores (Salas-Tornés & Hernández-Sánchez, 2015). Este cultivo además de ser ancestral, es indispensable para la elaboración de chocolates, además, de otros productos como bebidas, galletas, platillos tradicionales, barras entre otros representativos del sureste del país (Gobierno de México, 2020); la planta del cacao es un árbol cuyo fruto contiene entre 30 y 40 semillas que son sometidas a diferentes procesos como el tostado, el molido y mezclado con otros ingredientes como por ejemplo azúcar, vainilla y canela para poder formar el chocolate (Sol-Sánchez *et al.* 2016; Avendaño-Arrazate *et al.*, 2011), cabe mencionar que éste es consumido en todo el mundo por su agradable sabor pero también por sus propiedades funcionales, ya que se emplea tanto en la industria de los alimentos como en la farmacéutica y cosmetológica (Chávez-Rivera & Ordoñez-Gómez, 2013).

En las últimas décadas se han realizado estudios de los productos obtenidos del grano del cacao que han demostrado que además de aportar una gran cantidad de energía, son ricos en antioxidantes, y que los compuestos principales son catequinas y epicatequinas (Gutiérrez-Maydata, 2002); se han detectado polifenoles similares a los encontrados en los vegetales y el té que le confieren a la grasa del chocolate una particular resistencia a la peroxidación lipídica que representa una disminución de radicales libres y la quelación de metales (Negaresh & Marín, 2013); además de las características ya mencionadas, gracias a distintas investigaciones, se ha comprobado que posee propiedades antiinflamatorias debido a su contenido principalmente de flavonoides (Salas-Tornés & Hernández-Sánchez, 2015).

El jengibre, ha sido empleado durante años, debido a sus grandes propiedades, para el tratamiento digestivo o náuseas, pero diversos estudios han demostrado ser eficaz como antiinflamatorio, antiulceroso e inclusive puede llegar a influir en la disminución del colesterol y nivelar la presión arterial medicinales (Salgado, 2011). Cuenta con componentes bioactivos como los fenólicos y terpénicos los compuestos fenólicos más abundantes son gingeroles, shogaoles y paradoles (Mao *et al.*, 2019), los primeros son los más sobresalientes ya que se caracterizan por tener efectos analgésicos, sedantes e inclusive bacterianos y son los responsables de las diferentes funciones benéficas para la salud (Moghaddasi & Kashani, 2012).

México reporta una elevada prevalencia de sobrepeso y obesidad que se han convertido en detonadores de enfermedades cardiovasculares, diabetes e inclusive algunos tipos de cáncer (Herrera-Chalé *et al.*, 2014). Una de las principales causas es un predominante ambiente obesogénico (FAO, 2020), donde los alimentos nutritivos son menos accesibles y asequibles para algunas comunidades que, tienden a centrar su atención gracias a la publicidad en productos que son perjudiciales para la salud. Ahora bien, hay que considerar que la diabetes se está convirtiendo rápidamente en la epidemia de este siglo y en desafío para la salud mundial (Hernández-Ávila *et al.*, 2013); de acuerdo con los datos proporcionados por la OMS (2021) se sabe que, a nivel global, de 1980 a 2014 casi cuatuplicó su cifra a 422 millones de personas padecen diabetes, y en la industria alimentaria, hay pocos productos que están enfocados en esta problemática, por lo que es gran importancia la implementación de alimentos funcionales como en este caso una barra de chocolate adicionada con jengibre la cual podría aportar grandes beneficios para salud dado que cuentan con la presencia de polifenoles que actúan principalmente como antioxidantes que se caracterizan por llegar a tener efectos anticancerígenos, antiinflamatorios, inmunomoduladores, antimicrobianos entre otros (Castro *et al.*, 2016; Hii *et al.*, 2009).

Por las cualidades benéficas presentadas por ambos alimentos se decidió elaborar como producto una barra de chocolate adicionada con jengibre mínimamente procesada que pudiera ser funcional, agradable al paladar y bajo en azúcar ya que podría ser una alternativa para el consumo del público en general

contribuyendo con una sana y adecuada alimentación para personas con enfermedades tales como la diabetes u osteoartritis. Con el producto ya elaborado, en este trabajo, se pretende realizar un análisis por medio de espectrometría para poder cuantificar metabolitos de interés como lo son las antocianinas, flavonoides y fenoles y comprobar un posible efecto antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Barras de chocolate

Maridaje y prueba de palatabilidad

Se realizaron pruebas sensoriales de maridaje y palatabilidad con un panel semientrenado para determinar la formulación más aceptada para la elaboración de la barra de chocolate empleando dos concentraciones y dos diluyentes distintos de acuerdo con el diseño experimental del Cuadro I. De esta etapa del proyecto se determinó el uso de la muestra 11 como mezcla base para continuar con las demás pruebas debido a su aceptación.

Cuadro I. Maridaje con dos concentraciones y disolventes.

Muestra	Agua (mL)	Leche (mL)	Chocolate (g)	Jengibre (g)	Temperatura (°C)
M1	100	-	40	-	25
M2	100	-	40	1	25
M3	100	-	40	2	25
M4	100	-	40	-	94
M5	100	-	40	1	94
M6	100	-	40	2	94
M7	-	100	40	-	25
M8	-	100	40	1	25
M9	-	100	40	2	25
M10	-	100	40	-	94
M11	-	100	40	1	94
M12	-	100	40	2	94

Elaboración de las barras de chocolate

Tomando como base la formulación de la muestra M11, se realizaron barras de chocolate adicionadas con jengibre con algunas variantes en su formulación para evaluar su contenido de antocianinas, flavonoides y polifenoles, mismas que se presentan el Cuadro II.

Cuadro II. Variantes de las barras de chocolate.

Clave de la barra de chocolate	Características
TC-SA	Cacao en polvo sin azúcar
TC-CA	Cacao en polvo con azúcar
TCG-SA	Molido desde el grano sin azúcar

Extractos

A un gramo de barra de chocolate adicionada con jengibre se agregaron 10 mL de metanol acuoso a 80% (v/v) la mezcla se homogenizó mediante agitación en un vórtex, posteriormente se almacenó en un lugar oscuro y en reposo durante 48 horas. Finalmente, se filtró y aforó a 25 mL con la misma disolución de extracción. El líquido obtenido se almacenó en refrigeración para las pruebas químicas de cuantificación de los metabolitos de interés, de acuerdo con la metodología propuesta por Chang *et al.* (2002).

Determinación de antocianinas

Para hacer pruebas de antocianinas se emplearon dos soluciones buffer, una con pH de 1.0 (ácido clorhídrico / cloruro de potasio) y la otra con pH de 4.5 (ácido acético / acetato sódico). Por triplicado, a 0.2 mL extracto crudo de cada barra de chocolate se agregaron 1.8 mL de los buffer correspondientes teniendo como resultado 2 muestras equivalentes a estos. Enseguida, las muestras se colocaron en un vórtex de agitación y se leyeron a 510 nm y 700 nm. Esta prueba se realizó por triplicado con la finalidad de cuantificar los flavonoides en las muestras.

Empleando el método de diferencia de pH (Kuskoski *et al.* 2005), se puede calcular la absorbancia final a partir de las siguientes ecuaciones:

Absorbancia

$$A_T = (A_{510} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1.0} - (A_{510} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5}$$

Antocianinas finales

$$\text{Antocianinas monomérica} = \frac{A_T * PM * FD * 100}{(\epsilon * 1)}$$

Dónde: A = Absorbancia; PM = peso molecular (449.2 g mol⁻¹); FD = factor de dilución; ϵ = absortividad molar estándar (26 900).

Determinación de flavonoides

Por triplicado, a 0.5 mL extracto crudo de cada muestra se le agregó metanol acuoso a 95 %, después se le añadió 0.1 mL de cloruro de aluminio al 10 %, cuando la mezcla estuvo lista, se le incorporó 0.1 mL de acetato de potasio. Finalmente se aforó con agua destilada, se dejó en agitación en vortex y se colocó en incubación durante un periodo de 30 min en oscuridad; finalmente se leyeron los duplicados de todas las muestras a 415 nm. Se elaboró una curva estándar a base de flavonol quercetina en concentración máxima de 1.5 mM (Chang *et al.* 2002).

Determinación de polifenoles

Por triplicado, a 1 mL de extracto crudo de cada muestra de las barras de chocolate se le agregó 1 mL Folin-Ciocalteu 2 N, cuando la preparación se homogenizó, se añadieron 8 mL carbonato de sodio; enseguida se sometió a agitación en vortex hasta lograr la mezcla correspondiente. Finalmente, se incubó durante dos horas y se leyó a 765 nm. Se elaboró una curva estándar de ácido gálico en concentración máxima 1.0 mM (Waterman y Mole *et al.* 1994).

Análisis estadístico

El manejo de los datos estadísticos se llevó a cabo en el procesador de datos SAS System 9.0 para Windows mediante un ANOVA simple y diferencia de medias de Tukey ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de antocianinas

Derivado de la lectura de absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro a 510 nm y 700 nm se procedió a calcular las antocianinas totales por medio del método por diferencia de pH que sugiere Kuskoski *et al.* (2005). Finalmente se calculó la concentración de pigmentos monoméricos en el extracto correspondientes a cianidina-3-glucósido logrando los valores presentes en el Cuadro III.

Cuadro III. Cuantificación de antocianinas.

Clave	mg cianidina-3-glucósido 100 g ⁻¹ p.f.*
TC-CA	0.346 ± 0.172 ^b
TC-SA	0.362 ± 0.010 ^b
TCG-SA	1.390 ± 0.127 ^a

* El extracto se realizó con barras de chocolate adicionada con jengibre y la cuantificación se realizó en el extracto de peso fresco de la muestra.

Los valores de las barras de chocolate muestran que la TCG-SA obtuvo mayor cantidad de antocianinas; esta diferencia se puede deber al estado de la materia prima. Por otro lado, haciendo una comparación con los datos obtenidos por Nazario *et al.* (2014) en grano seco de cacao los valores de antocianinas conseguidos en la barra de chocolate adicionada con jengibre fueron menores a los esperados. A su vez, según los resultados presentados por Ordoñez *et al.* (2020) en nibs de cacao su rango varió de 0.219 ± 0.001 a 0.091 ± 0.001 mg cianidin-3- glucósido/g muestra mientras que a barra de chocolate adicionada con jengibre obtuvo resultados de 1.389 ± 0.13 a 0.345 ± 0.17 .

Determinación de flavonoides

Después de obtener las lecturas a 415nm en el espectrofotómetro de las absorbancias se comparó cada una de estas con una curva patrón previamente construida con quercetina para poder cuantificar los valores de flavonoides presentes en cada una de las barras de chocolate consiguiendo los datos mostrado en el Cuadro IV.

Cuadro IV. Cuantificación de flavonoides.

Clave	mg EQ 100 g ⁻¹ p. f.*
TC-CA	50.969 ± 0.876 ^a
TC-SA	27.082 ± 2.57 ^b
TCG-SA	25.767 ± 1.2 ^b

*La referencia empleada fue quercetina y se cuantificó mg equivalentes de quercetina por cada 100 g de peso fresco de la barra de chocolate adicionada con jengibre.

Como se puede observar en el Cuadro IV, la barra que mostró mayor contenido de flavonoides fue la TC-SA, los cuales fueron considerablemente superiores reportados por Núñez-Torres *et al.* (2020), Su presencia hace posible el empleo de este producto con valor agregado ya que se caracterizan por tener una alta capacidad antioxidante (Ochoa & Ayala, 2004).

Determinación de polifenoles

La cantidad de polifenoles en las muestras fue calculada haciendo uso de la curva patrón de ácido gálico, después de haber leído las muestras a 765 nm en el espectrofotómetro, obteniendo los valores presentados en el Cuadro IV en que se observa diferencia significativa que depende directamente de la formulación analizada.

Cuadro V. Cuantificación de fenoles.

Clave	mg EAG 100 g ⁻¹ p. f.*
TC-CA	623.492 ± 4.832 ^a
TC-SA	578.16 ± 17.716 ^b
TCG-SA	531.77 ± 9.206 ^c

*La referencia empleada fue ácido gálico y se cuantificó mg equivalentes de quercetina por cada 100 g de peso fresco de la barra de chocolate adicionada con jengibre.

De las tres formulaciones de las barras de chocolate, la muestra TC-CA fue la que obtuvo mayor cantidad de polifenoles, esto se debe a la presencia de azúcar, ya que esta diseñada a base de caña de azúcar y de acuerdo con Jiménez *et al.* (2014) cuenta con la presencia de polifenoles antioxidantes. Ahora bien, de acuerdo con los valores de polifenoles totales obtenidos por Nazario *et al.* (2014) en granos de cacao se puede apreciar una considerable disminución de estos.

CONCLUSIÓN

Se sabe que el cacao y el jengibre por si solos pueden producir efectos benéficos para la salud del ser humano ya que entre sus características principales destacan el poder antiinflamatorio y antioxidante, razón por la cual se realizó la combinación de ambos, obteniéndose con éxito barras de chocolate cuyo consumo podría proveer de efectos positivos para el consumidor.

El consumo habitual de barras de chocolate en la población permite considerar la viabilidad de este proyecto, además de que los de flavonoides, fenoles y antocianinas indican la presencia de estos compuestos en el producto, y al existir se puede dar por hecho que tiene alto potencial antioxidante.

Por otra parte, se realizaron barras con bajo o nulo contenido de azúcar con la intención de llegar a más personas, especialmente las que padecen enfermedades como: la osteoporosis, la diabetes, patologías cardiovasculares; considerándose como un producto saludable y funcional.

BIBLIOGRAFÍA

- Avendaño-Arrazate, C. H., Villareal-Fuentes, J. M., Campos-Rojas, E., Gallardo-Méndez, R. A., Mendoza-López, A., Aguirre-Medina, J. F., Sandoval-Esquivel, A. S., & Espinosa-Zaragoza, S. (2011). *Diagnóstico del Cacao en México*. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Castro, M., Hernández, J. A., Mancilla, S., Córdova, J. S., Solari, F. A. & Chire, G.C. (2016). Efecto del contenido de grasa en la concentración de polifenoles y capacidad antioxidante de *Theobroma cacao* L. "cacao". *Ciencia e investigación*, 19(1): 19-23.
- Chang C. C., Yang, M. H., Wen, H.-M. & Chern, J. C. (2002) Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10: 78- 182.
- Chávez-Rivera, R. E. & Ordoñez-Gómez, E. S. (2013). Polifenoles Totales, Antocianinas y Capacidad Antioxidante (DPPH y ABTS) durante el procesamiento del licor y polvo de cacao. *ECI Perú*, 10(1): 43-51.
- FAO (2020). *Azúcares añadidos son el 12.5% en la dieta de las y los mexicanos: INSP*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <https://www.fao.org/mexico/noticias/detail-events/fr/c/1307077/>
- Gobierno de México (2020). Del campo a tu paladar, el cacao, un cultivo tradicional. <https://www.gob.mx/fnd/articulos/del-campo-a-tu-paladar-el-cacao-un-cultivo-tradicional?idiom=es>
- Gutiérrez-Maydata, B. A. (2002). Chocolate, Polifenoles y Protección a la Salud. *Acta Farm Bonaerense*, 21(2): 149-152.
- Hii, C.L., Law C. L. Suzannah S. & Cloke, M. (2009). Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, Vol.2: 702-722.
- Hernández-Ávila, M., Gutiérrez, J. P. & Reynoso-Noverón, N. (2013). *Diabetes mellitus* en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública de México*, 55: 129-136.
- Herrera-Chalé, F., Betancur-Ancona, D. & Segura-Campos, M. R. (2014). Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos. *Nutrición Hospitalaria*, (29)1: 10-20.
- Jiménez, R., González, N., Hernández, M. & Ojeda, N. (2014). La caña de azúcar como alimento funcional. *Revista iberoamericana de ciencias*, 1: 31-39.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(4): 726-732.
- Mao, Q. Q., Xiao-Yu, X., Shi Yu, C., Ren-Tú, G., Harold, C. & Hua-Bin, L. (2019). Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*, 8(6): 1-21.
- Moghaddasi, M. S. & Kashani, H. H. (2012). Ginger (*Zingiber officinale*): A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(26): 4255-4258.
- Nazario, O., Ordóñez, E., Mandujano, Y. & Arévalo, J. (2014). Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y siete clones. *Investigación y Amazonia*, 3(1), 51-59.
- Negaraesh, S. & Marín. I. y (2013). El cacao y la salud humana: propiedades antioxidantes del cacao nicaragüense y productos alimenticios comercializados. *Agroforestería en las américas*. 49, 93-98.
- Núñez-Torres, D., Bayas-Morejon, F. & Ramón-Curay, E. R. (2020). Desarrollo de barras de cacao (*Theobroma cacao*) "chocolate", para aprovechar sus propiedades bioactivas, en la asociación de mujeres de "San Gerardo" del Cantón Echeandía. *Revista Pertinencia académica*, 4: 1-10.
- Ochoa, M. & Ayala, A. (2004). Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. *Ingeniería y competitividad*, 6: 93-104.
- OMS (2021). *Diabetes*. Organización Mundial de la Salud. who.int. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

- Ordoñez, E. S., Quispe, Y. & García, L. F. (2020). Cuantificación de fenoles, antocianinas y caracterización sensorial de nibs y licor de cinco variedades de cacao, en dos sistemas de fermentación. *Scientia Agropecuaria*, 11(4): 473-481.
- Salas-Tornés, J. & Hernández-Sánchez, L.Y. (2015). Cacao, una aportación de México para el mundo. *Ciencia*. 32-39.
- Salgado, F. (2011). El jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Internacional de Acupuntura*. 5: 167-173.
- Sol-Sánchez, A., Naranjo-González, J.A, Córdova-Ávalos, V., Ávalos de la Cruz, D. A., & Zaldívar-Cruz, J. M. (2016). Caracterización bromatológica de los productos derivados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en la Chontalpa, Tabasco, México. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*, 7(14): 2817-2830.
- Waterman, P.G. & S. Mole. (1994) *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*. Methods in Ecology. Black well Scientific Publications. Oxford, UK. 238 p.