

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

“Desarrollo de un ingrediente funcional alto en fibra
formulado a partir de subproductos del cacao, evaluación de
su efecto sobre el ciclo circadiano”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctora en Ciencias de los Alimentos

Presenta

MC. Dafne Velásquez Jiménez

Dirigida por

Dra. Rocio Campos Vega

Co-Director:

Dr. Manuel Miranda Anaya

Querétaro, Querétaro. 8 de agosto de 2025.

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



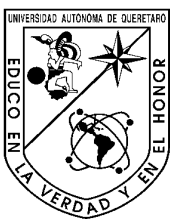
SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado en Ciencia de los Alimentos

“Desarrollo de un ingrediente funcional alto en fibra formulado a partir de subproductos del cacao, evaluación de su efecto sobre el ciclo circadiano”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctora en Ciencias de los Alimentos

Presenta

MC Dafne Velásquez Jiménez

Dirigida por

Dra. Rocio Campos Vega

Co-dirigido por:

Dr. Manuel Miranda Anaya

Dra Rocio Campos Vega
Presidente

Dr. Manuel Miranda Anaya
Co-Director

Dra. Marcela Gaytán Martínez
Vocal

Dr. Alan Javier Hernández Álvarez
Suplente

Dr. Ramón Gerardo Guevara González
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Agosto, 2025
México.

*A mi mamá coyo, güera hermosa esto es por ti y por las que no
pudieron estudiar. Hasta el cielo
Para Roberto, por motivarme, apoyarme y cuidarme. Te amo guapo*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca otorgada para realizar el doctorado, con el número de CVU 937985.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, especialmente al programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos, por el constante apoyo y la oportunidad para obtener mi grado. Específicamente quisiera agradecer a los financiamientos FONFIVE-UAQ 2024 (FQU202410) y FOPES- Química Somos Todos 2023, con los cuales fue posible llevar a cabo el presente proyecto. De manera más personal, agradezco al Dr. Santos y la Dra. Silvia por el apoyo otorgado tanto por la Facultad de Química como por Rectoría para poder financiar parte de mi estancia internacional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla por prestar el espacio para llevar a cabo parte de mi tesis. Especialmente a la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación y al Laboratorio de Cronobiología funcional y al Bioterio del Instituto de Neurobiología. Agradezco también el financiamiento FC-UMDI-J 123219 por el presupuesto otorgado para poder realizar mi proyecto.

A la Dra. Rocio Campos Vega por su apoyo y confianza ciega desde el inicio, por su acompañamiento en todo momento, por preocuparse por mi tanto de forma profesional como personal. Agradezco infinitamente que me haya abierto las puertas de su laboratorio, que me diera la oportunidad de crecer como estudiante, profesional y como persona, por todas las veces que me incluyó en sus proyectos para que me formara como la profesional que soy ahora.

Al Dr. Manuel Miranda Anaya por su apoyo incondicional a lo largo de todo el proyecto, desde responder mis dudas a cualquier hora, hasta limpiar jaulas, rellenar bebederos y reponer alimento. Muchas gracias por estar siempre al pendiente tanto del proyecto como de mi persona, por la confianza y la convivencia brindada en este tiempo.

A mi comité de tesis, la Dra. Marcela Gaytán Martínez, el Dr. Ramón Gerardo Guevara Gonzalez y el Dr Alan Hernandez Alvarez, por sus aportaciones al proyecto, por siempre estar dispuestos a ayudar ante cualquier duda, inconveniente o equipo que necesitara.

A la Universidad de Granada, al grupo de trabajo “Bioactive Ingredients” en la facultad de química analítica, por permitirme realizar parte de mi trabajo en sus instalaciones. Agradezco especialmente al Dr. Alvaro Fernandez Ochoa y al Dr. Antonio Segura Carretero por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar una colaboración, por estar al pendiente de mi durante toda la estancia y por establecer una nueva red de contactos y oportunidades.

Al Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada (IPN-CICATA Querétaro), especialmente al Laboratorio de Tecnología en Alimentos y al Dr. Eduardo Morales Sánchez por permitirme hacer uso de sus instalaciones para el procesamiento de mis muestras, así como para mejorar los tratamientos.

A quienes aportaron al proyecto de manera más personal, ya sea con apoyo de laboratorio o capacitaciones, quisiera agradecer a: Ing. en Biotecnol. Claudia Rocío Salazar Mondragón, Dra Elvira del Carmen Arellanes Licea y al Dr. Iván Luzardo Ocampo.

A Roberto, por siempre estar a mi lado. Gracias por nunca dejarme sola, porque en los días mas pesados de laboratorio tu estabas ahí al llegar a casa y cambiar mi ánimo, por acompañarme en las largas noches de escritura y las noches de ir al laboratorio, por siempre estar al pendiente que no olvidara comer y cuando ya era demasiado café. Gracias por ser parte de mi vida y ayudarme a realizar un logro tan importante para mí.

A mi familia: mamá, papá, Gamaliel y Dámaris. Por estar siempre apoyándome en todas mis etapas, para lo que sea que se necesite y sin importar cuanto tiempo me tome llegar a cumplir mis sueños; porque, aunque a veces no entendían ni lo que les estaba contando me decían “que bonito se ve” y daban los ánimos para continuar. Gracias por estar siempre apoyándome, inspirándome y motivándome a seguir.

A mis primos, primas, tíos, tías, sobrinos, sobrinas, abuelos y abuelas † pues siempre soy la familiar que está lejos, estudiando o terminando una tesis y se pierde de eventos familiares pero siempre están al pendiente de mi y apoyándome en mis metas.

A mis amigos en Hermosillo: Karla, Diana, Hervey, Omar, Dany, Enrique, Carolina, Cristian, Luis, Roxana, Dani Varela, Francisco, Meda, Carlos, Cano, Martín, Katya, Leira y Yesi. Gracias por estar apoyándome, animándome y viéndome crecer desde lejos, también por permanecer con su amistad intacta a pesar de la distancia.

A los amigos que me regaló la UAQ/UNAM: Lady, Elisa Domínguez, Karen, Kass, Angelica, Madeleine, Sarah Lee, Yantziry, Lupita, Max, Fer Buergos, Fer Revueltas, Stephanie, Lorraine, Paola, Juan Carlos, Grecia, Claudio, Karina, Dámaris, Manuel, Nicole, Yenni, Francisco, Pablo y Viri. Gracias por hacer de estos cuatro años más llevaderos, por acompañarnos en los días interminables de laboratorio y apoyarnos en todo momento.

A mis amigos en España que, aunque fue muy poco tiempo el que convivimos se aseguraron de que me sintiera como en casa: Ying, Lisa, Patricia, Andrea, Abigail, Alejandro, Maricarmen y Victoria.

CONTENIDO

I. INDICE DE CUADROS	9
II. INDICE DE FIGURAS	11
III. RESUMEN	14
IV. ABSTRACT	15
V. INTRODUCCIÓN	16
VI. ANTECEDENTES	18
a. La cadena productora de cacao genera más subproductos agroindustriales que porciones comestibles	18
1. Obtención de granos de cacao y subproductos	18
2. Composición de los subproductos de cacao	19
3. Potencial de los subproductos de cacao para ser utilizados en la composición de un alimento	22
b. Los alimentos nutraceuticos pueden ejercer beneficios a la salud de los consumidores	23
c. El ciclo circadiano y su regulación como coadyuvante de enfermedades crónico-degenerativas no transmisibles	25
1. El reloj biológico se regula a través de mecanismos específicos, controlados por diversos genes y la hora del día	25
2. Las modificaciones en los genes de reloj llevan a repercusiones en la salud	28
3. No todos los ciclos del reloj biológico duran exactamente 24 horas	29
4. El reloj biológico se puede ver modificado por los compuestos presentes en los alimentos consumidos	30
5. La desincronización circadiana puede medirse a través de la actividad locomotora	31
6. Las dietas altas en grasa alteran el reloj biológico, con efectos secundarios adversos	32
7. Los compuestos fenólicos ejercen un efecto sobre el reloj biológico	34
8. La microbiota intestinal ejerce un efecto directo sobre los genes reloj	36
9. Algunos metabolitos de la microbiota colónica, generados al fermentarse la fibra dietaria, modifican el ciclo circadiano	38

d.	Modificar la expresión de los genes reloj como terapia para regular diversas patologías.....	39
e.	Los subproductos de cacao tienen potencial para modificar el ciclo circadiano al incluirse dentro de un alimento	41
i.	Adición de la vaina de cacao en alimentos	41
2.	Potencial de la cascarilla de cacao de adicionarse en alimentos.....	42
3.	Potencial de los compuestos bioactivos de los subproductos de cacao provenientes de otras matrices	44
VII.	OBJETIVOS	48
a.	Objetivo General.....	48
b.	Objetivos específicos	48
VIII.	METODOLOGÍA.....	49
a.	Etapla 1: Diseño y caracterización del ingrediente de cacao	49
1.	Materias primas, su procesamiento y caracterización.....	49
2.	Diseño y caracterización del ingrediente funcional de subproductos de cacao	51
3.	Análisis estadístico de la Etapla 1	52
b.	Etapla 2: Modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa	52
1.	Estructuración del modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa	53
2.	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad locomotora en un modelo murino	56
3.	Eutanasia y recolección de muestras biológicas.....	57
4.	Análisis estadístico para el modelo murino	57
c.	Etapla 3: Evaluaciones ex-vivo a los tejidos colectados del modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa.....	58
1.	Perfil lipídico y glucosa sanguínea	58
2.	Cuantificación de la expresión de los genes del reloj en órganos y tejidos	59
3.	Análisis de biodisponibilidad de compuestos bioactivos en sangre y tejidos colectados.....	61
IX.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
a.	Etapla 1: Diseño y caracterización del ingrediente de cacao	66
1.	Caracterización de las materias primas	66

2.	Caracterización de las mezclas diseñadas a partir de vaina y cascarilla de cacao	74
b.	Etapa 2: Modelo murino desincroniza por una dieta alta en grasa	81
1.	Efecto de los diferentes tratamientos sobre parámetros de crecimiento en un modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa	82
2.	Caracterización de las dietas diseñadas para el modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa	85
3.	Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad locomotora en un modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa	92
c.	Etapa 3: Evaluaciones ex-vivo a los tejidos colectados del modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa	105
1.	Efecto del consumo del ingrediente de cacao sobre parámetros morfológicos y la química sanguínea de un modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa	105
2.	Expresión de genes de reloj y controlados por reloj en tejidos periféricos	108
3.	Análisis del metabolismo en los tejidos colectados del modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa	132
d.	Integración de los resultados obtenidos en el modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa	177
X.	CONCLUSIONES	181
XI.	REFERENCIAS	183

I. INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición proximal y nutracéutica seleccionada de los subproductos de cacao.	21
Cuadro 2. Diseño de mezclas para la formulación del ingrediente de subproductos de cacao.	52
Cuadro 3. Composición de las dietas utilizadas en el bioensayo.	55
Cuadro 4. Características de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR-RT de los genes reloj y el gen constitutivo	60
Cuadro 5. Parámetros utilizados en MZmine para construcción de cromatogramas y procesamiento de datos.	64
Cuadro 6. Composición proximal de los subproductos de cacao	67
Cuadro 7. Composición nutracéutica de los subproductos de cacao	69
Cuadro 8. Perfil fenólico por HPLC-DAD de los subproductos de cacao	70
Cuadro 9. Propiedades tecno-funcionales de los subproductos de cacao	73
Cuadro 10. Composición proximal de las mezclas diseñadas con vaina y cascarilla de cacao	75
Cuadro 11. Composición nutracéutica de las mezclas diseñadas con vaina y cascarilla de cacao	77
Cuadro 12. Perfil de compuestos fenólicos por HPLC-DAD de las mezclas realizadas con vaina y cascarilla de cacao.	78
Cuadro 13. Propiedades tecno-funcionales de las mezclas realizadas con vaina y cascarilla de cacao.	80
Cuadro 14. Composición química proximal de las dietas utilizadas para el modelo murino en cada uno de los tratamientos experimentales	86
Cuadro 15. Perfil fenólico y de metilxantinas de las dietas utilizadas en el modelo murino para cada uno de los tratamientos experimentales.	90
Cuadro 16. Parámetros morfológicos al momento del sacrificio para los diferentes tratamientos experimentales.	106

Cuadro 17. Parámetros bioquímicos al momento del sacrificio del modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa.	108
Cuadro 18. Cambios en la abundancia relativa de metabolitos plasmáticos analizados mediante UPLC-MS.	142
Cuadro 19. Cambios en la abundancia relativa de metabolitos hepáticos analizados mediante UPLC-MS.	156
Cuadro 20. Cambios en la abundancia relativa de metabolitos en tejido cerebral no-hipotalámico analizados mediante UPLC-MS.	173

II. INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Componentes del reloj circadiano	26
Figura 2. Regulación genética del ciclo circadiano en el bucle 1	28
Figura 3. Diagrama de procesamiento para las materias primas	50
Figura 4. Diagrama de la elaboración de dietas	56
Figura 5. Capacidad antioxidante de los subproductos de cacao, medida por diferentes métodos.	72
Figura 6. Capacidad antioxidante, medida por diferentes métodos, para las mezclas realizadas con vaina y cascarilla de cacao	79
Figura 7. Registro de peso semanal a lo largo de las 12 semanas de ensayo	80
Figura 8. Registro de consumo de alimento de 24 h durante las primeras 10 semanas de ensayo en fotoperiodo de luz/oscuridad regular.	84
Figura 9. Composición nutracéutica de las dietas utilizadas para el modelo murino	88
Figura 10. Capacidad antioxidante de las dietas utilizadas para el modelo murino.	92
Figura 11. Actogramas representativos de cada grupo experimental durante las 10 semanas de ensayo en fotoperiodo de luz:oscuridad regular (12:12).	93
Figura 12. Actividad en la fase de reposo y fase activa de cada grupo experimental durante las 10 semanas de ensayo en fotoperiodo de luz:oscuridad regular (12:12).	95
Figura 13. Desfase de la actividad con respecto al apagado de las luces (min) de los diferentes tratamientos experimentales	97
Figura 14. Ciclos ultradianos de actividad locomotora en los diferentes grupos experimentales después de 10 semanas de intervención.	99

Figura 15. Actogramas y periodogramas en oscuridad constante por 14 días	102
Figura 16. Valor numérico del periodo de los diferentes grupos experimentales del modelo murino durante el experimento en oscuridad constante por 14 días.	103
Figura 17. Comportamiento habitual de los genes de reloj.	109
Figura 18. Expresión relativa de genes de reloj y genes controlados por reloj en hígado.	110
Figura 19. Expresión relativa de genes de reloj en íleon.	116
Figura 20. Expresión relativa de Per2 en tejido adiposo epididimal	120
Figura 21. Expresión relativa de genes de reloj en hipotálamo.	123
Figura 22. Efecto del ingrediente de subproductos de cacao sobre los genes de reloj y modulados por reloj en diferentes tejidos, comparando las dietas altas en grasa.	127
Figura 23. Análisis de componentes principales (PCAs) de los diferentes tejidos analizados.	133
Figura 24. Análisis de componentes principales en el metaboloma de plasma.	134
Figura 25. Heatmap de las correlaciones de los 1243 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en plasma.	136
Figura 26. Heatmap de los promedios por subgrupo, comparando los 1243 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en plasma.	138
Figura 27. Análisis de componentes principales en el metaboloma de hígado.	151
Figura 28. Heatmap de las correlaciones de los 847 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en hígado.	153
Figura 29. Heatmap de los promedios por subgrupo, comparando los 847 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en hígado.	154
Figura 30. Análisis de componentes principales en el metaboloma de cerebro	167

Figura 31. Heatmap de las correlaciones de los 27 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en cerebro.	169
Figura 32. Heatmap de los promedios por subgrupo, comparando los 27 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en cerebro	171
Figura 33. Integración del efecto de la suplementación del ingrediente de subproductos de cacao sobre el modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa.	178

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

III. RESUMEN

El reloj biológico se puede desincronizar por el consumo de dietas altas en grasa (DAG). El consumo de compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos (CF) y los compuestos derivados de la fibra dietaria (FD) han demostrado revertir algunos de los efectos de las DAG. Los subproductos de cacao se caracterizan por tener CF y FD, siendo un potencial resincronizador biológico. El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar y evaluar un ingrediente funcional alto en fibra y CF, formulado a partir de la combinación de vaina y cascarilla de cacao, respecto a su efecto sobre la modulación del reloj biológico en hígado, tejido adiposo, intestino e hipotálamo en un modelo murino desincronizado por DAG. Se caracterizaron vaina y cascarilla de cacao para diseñar mezclas, las cuales se evaluaron en diferentes parámetros y se escogió aquella con mayor contenido de CF (28469 µg/g, $p < 0.05$), compuesta de dos partes de cascarilla con una de vaina, a la cual se le denominó ingrediente de subproductos de cacao (ISC). Se trabajó con un modelo murino compuesto de 48 ratones c57bl6/J, divididos en cuatro grupos sometidos durante 14 semanas a la dieta correspondiente: dieta estándar (STD), STD+ISC, DAG y DAG+ISC. En oscuridad constante los animales del grupo DAG+ISC tuvieron un periodo de actividad similar al STD (23.9 h), revirtiendo el efecto de la DAG (24.9 h, $p < 0.05$). Los genes de reloj y los modulados por reloj, en hígado, intestino y tejido adiposo recuperaron su expresión y oscilación en el grupo DAG+ISC al compararlo con la DAG; en hipotálamo se recuperó la oscilación de *Bmal1* pero se tuvo un efecto contrario en *Per2* en el grupo DAG+ISC. El ISC logró modificar ($p < 0.05$) el metaboloma en plasma, hígado y cerebro, encontrando metabolitos y catabolitos de CF, así como derivados de la FD, con mayor efecto sobre la dieta estándar. La suplementación con ISC llevó a presencia de los metabolitos de CF y FD en los tejidos estudiados, que moduló la expresión de genes de reloj, que a su vez recuperó los patrones de actividad locomotora; esto indica el potencial del ISC para prevenir la desincronización circadiana inducida por DAG.

IV. ABSTRACT

The biological clock can be altered by high-fat diets (HFD). The intake of bioactive compounds such as phenolic compounds (PC) and fiber-derived compounds (FD) has shown potential to reverse the effects of HFD. Cacao by-products are rich in PC and FD, making them a potential biological resynchronizer. This study aimed to develop and evaluate a functional ingredient high in fiber and PC, formulated by combining cacao husk and pod, and assess its effect on biological clock modulation in the liver, adipose tissue, intestine, and hypothalamus in a murine model desynchronized by HFD. Cacao husk and pod were analysed to design different mixtures. The selected blend, with the highest PC content (28,469 µg/g, $p < 0.05$), was composed of two parts husk and one part pod, named cacao by-product ingredient (CBI). A total of 48 C57BL6/J mice were divided into four groups and fed for 14 weeks with one of the following diets: standard diet (STD), STD+CBI, HFD, and HFD+CBI. Under constant darkness, mice in the HFD+CBI group had an activity period similar to STD (23.9 h), reversing the effect of HFD (24.9 h, $p < 0.05$). Clock genes and clock-controlled genes in liver, intestine, and adipose tissue regained expression and rhythmicity in the HFD+CBI group compared to HFD. In the hypothalamus, *Bmal1* oscillation was restored, but *Per2* was adversely affected in the HFD+CBI group. CBI significantly modified ($p < 0.05$) the metabolome in plasma, liver, and brain, revealing the presence of PC and FD metabolites, with stronger effects under STD conditions. Supplementation with CBI led to the presence of PC and FD metabolites in the studied tissues, modulating clock gene expression and recovering locomotor activity rhythms. These findings suggest the potential of CBI to prevent circadian desynchronization caused by HFD.

V. INTRODUCCIÓN

El reloj biológico es el mecanismo que nos permite ubicarnos dentro de las 24 horas del día (Arola-Arnal *et al.*, 2019). La regulación de los relojes centrales y periféricos se da por diversos factores conocidos como *Zeitgebers* entre los cuales se encuentra la luz, la actividad física, los alimentos y los compuestos presentes en estos (Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020). Cuando el horario de actividad locomotora no coincide con el que le correspondería con los *Zeitgeber* se puede dar un estado de desincronización circadiana. La desincronización de los relojes ya sea de manera genética o por malos hábitos como es el consumo de dietas altas en grasa (DAG), puede ocasionar ciertas enfermedades y comorbilidades como el síndrome metabólico y llevar al desarrollo de la obesidad (Arola-Arnal *et al.*, 2019).

Generar tratamientos que puedan colaborar a disminuir la prevalencia de la obesidad es un área de oportunidades para la investigación en alimentos nutraceuticos. Los compuestos derivados de la fibra dietaria, así como los compuestos fenólicos se han evaluado respecto a la capacidad de revertir la desincronización de los relojes periféricos (hígado, intestino, tejido adiposo, entre otros), sirviendo como un coadyuvante para revertir sus efectos secundarios (Leone *et al.*, 2015; Ribas-Latre *et al.*, 2015a; Ribas-Latre *et al.*, 2015b; Tahara *et al.*, 2018). De manera que estos compuestos podrían ser aprovechados como una terapia para combatir la prevalencia de obesidad a través de la reversión de la desincronización circadiana.

El cultivo y la comercialización del cacao representan una ganancia económica importante para nuestro país, y se espera que el aumento en su producción y demanda genere en un área de oportunidades a ser explotada (México, 2020, 2021). Los granos de cacao deben ser extraídos de las vainas, fermentarse y tostarse antes de poder ser destinados a un fin comercial, lo que genera subproductos en cantidades mayores a la sección aprovechable (Chamaidan-Laines, 2020; Grillo *et al.*, 2019; Oddoye *et al.*, 2013). Estos subproductos incluyen la vaina y cascarilla, los cuales presentan una composición nutraceutica rica en compuestos fenólicos y fibra, tanto soluble como insoluble (Vasquez

et al., 2019). Los compuestos bioactivos presentes en el cacao, siendo principalmente epicatequina y fibra dietaria, han demostrado capacidad para modificar el reloj biológico (Casanova *et al.*, 2014; Ribas-Latre *et al.*, 2015a; Ribas-Latre *et al.*, 2015b); estas evaluaciones se han realizado en los compuestos provenientes de otras matrices alimentarias o en forma de compuestos puros.

La presencia de estos compuestos en los subproductos de cacao indica que podrían destinarse para un ingrediente funcional con el fin de modular la sensación de saciedad y revertir la desincronización del ciclo circadiano. Con toda esta evidencia, los subproductos de cacao representan un área de oportunidades en la creación de un ingrediente alimentario con carácter nutracéutico dirigido específicamente a revertir la desincronización biológica ocasionada por una dieta alta en grasa con el fin de coadyuvar al tratamiento de la obesidad.

VI. ANTECEDENTES

a. La cadena productora de cacao genera más subproductos agroindustriales que porciones comestibles

Theobroma cacao L., conocido como cacao, es un cultivo con alta demanda a nivel mundial debido a la popularidad, variedad y versatilidad de los productos obtenidos a partir de sus granos. Una vez cosechados los granos son procesados y utilizados para la generación de alimentos e ingredientes derivados, tales como cocoa en polvo, manteca, licores y chocolates (Vasquez *et al.*, 2019). Las condiciones climáticas en algunas regiones de México permiten la producción de cacao, llevando a que simbolice un ingreso económico significativo para el país. Se espera que para el 2030 la cosecha anual rebase las 47 mil ton, resaltando la importancia del cacao para la economía mexicana (SAGARPA, 2017). Los primeros registros del consumo de este cultivo fueron del pueblo maya, quienes le asignaron por nombre “el alimento de los dioses”, debido a los beneficios atribuidos a la salud que otorga su consumo; consiguiendo así posicionarse en la gastronomía tradicional mexicana desde hace siglos, donde se utilizan los granos fermentados para alimentos como el taxcalate, pozol, popo y téjate (De Araujo *et al.*, 2016; México, 2020).

1. Obtención de granos de cacao y subproductos

Sin importar cuál que sea el destino final para los granos de cacao, el proceso de obtención es siempre el mismo, y lleva prácticamente intacto desde el México prehispánico. Los frutos se recolectan al alcanzar la madurez comestible, posteriormente, usando un cuchillo se realiza un corte transversal a la vaina para extraer la pulpa, el mucilago y los granos a la par que las vainas y la placenta son colocadas en el suelo (Vasquez *et al.*, 2019). A lo largo del procesamiento, las partes del fruto y el grano que no son utilizadas van desechándose, provocando cantidades de subproductos que exceden a la porción comestible del fruto.

En el caso del cacao, los granos componen alrededor de un tercio del peso total, provocando que las dos terceras partes restantes sean desechadas. En su cadena de producción existen cuatro subproductos: vainas vacías, placenta, mucilago y cascarilla. De estos, la vaina vacía representa valores desde el 67 al 74 % del total del fruto, resultando en el más relevante en cuestión de cantidades (Oddoye *et al.*, 2013; Vriesmann *et al.*, 2011). Por su parte, la fermentación y tostado de los granos también genera la producción de cascarilla que alcanza valores hasta el 20 % de la composición total del grano y se obtiene al desprenderse después de fermentar y tostar las semillas (Grillo *et al.*, 2019). Si se lleva a cabo una extrapolación de la cantidad de granos obtenidos por fruto, se estima que, por cada tonelada de grano de cacao fermentado y seco, se producen diez toneladas de subproductos que no tienen un uso definido (Campos-Vega *et al.*, 2018). Al tomar el caso particular de México, de las casi 28,500 ton de cacao cosechado en el 2023 se estima la obtención de 21,000 ton de subproductos sin aprovecharse entre los cuales destacan la vaina vacía y cascarilla.

Estos subproductos ocasionan repercusiones en diferentes ámbitos, como pueden ser económicos y ambientales. Las altas cifras de desechos generados afectan a los productores al reducir las ganancias significativamente, provocando deserción ocasionada por el bajo rendimiento; algunos estudios sugieren que comercializar los subproductos puede representar un atractivo para los agricultores al incrementar las ganancias hasta en un 18 % (Oddoye *et al.*, 2013). Vasquez *et al.* (2019), sugieren que el adecuado uso de la biotecnología y técnicas de extracción dirigidas a compuestos de interés, pueden resultar una manera efectiva de darle un valor agregado a los subproductos de la cadena productora de cacao.

2. Composición de los subproductos de cacao

En la **Cuadro 1** se presenta la composición proximal de los subproductos de cacao, incluyendo a las vainas vacías. La cantidad de proteína y lípidos puede variar dependiendo del cultivar estudiado, pero en general se estima que presentan valores de alrededor del 6.5 y 1 %, respectivamente. Su alto contenido de minerales,

específicamente de potasio, hace que se utilicen como fertilizante (Vasquez *et al.*, 2019). Por su contenido de proteína, se destinan a la alimentación de ganado siendo importante tener en cuenta las dosis máximas, ya que en altas concentraciones puede ocasionar pérdidas de peso (Delgado-Ospina *et al.*, 2021b). Además de su composición proximal, las vainas de cacao se caracterizan por un alto contenido de compuestos bioactivos, entre los cuales destacan la fibra y los compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos totales en la vaina pueden alcanzar valores de hasta 26 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g de peso seco (PS), dependiendo de la variedad, método para secar, así como el tratamiento previo a su secado; sucediendo algo similar con los flavonoides que alcanzan valores hasta de 2.9 EC/g PS (Delgado-Ospina *et al.*, 2021b). El interés de la presencia de compuestos bioactivos ha llevado a que se caractericen más a fondo respecto a su perfil fenólico. Se han encontrado compuestos como ácido gálico, clorogénico, caféico, protocateico e hidroxibenzoico, así como flavonoides del tipo quercetina, catequina, kaempferol, epicatequina, isoquercetina y apigenina (Delgado-Ospina *et al.*, 2021b; Irondi *et al.*, 2019; Karim *et al.*, 2014).

La vaina de cacao tiene como principal componente a los carbohidratos, destacando entre ellos el contenido de fibra que alcanza valores de hasta 65 % de los carbohidratos totales cuando se encuentra en forma de harina (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020). El perfil de fibra en la vaina de cacao está compuesto de tres cuartas partes de fibra insoluble, destacando sus cadenas de celulosa, lignina y en menor proporción hemicelulosa (Ruesgas-Ramón *et al.*, 2020; Vriesmann *et al.*, 2011). La cantidad de fibra soluble en las vainas alcanza valores del 7.9 %, siendo la principal cadena de esta la pectina, representando el 6.1 % del peso total de la vaina (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020; Sobamiwa *et al.*, 1994).

Cuadro 1. Composición proximal y nutracéutica seleccionada de los subproductos de cacao.

Componente	Vaina deshidratada	Cascarilla tostada
Humedad (%)	1.1-6.4	1.9
Proteína (%)	5.7-6.5	15.2
Lípidos (%)	0.6-0.8	15.1
Cenizas (%)	7.4-8.9	7.0
Magnesio (mg/kg)	254	480-1290
Calcio (mg/kg)	110.9	230-440
Potasio (mg/kg)	2768	1250-1820
Carbohidratos (%)	78.9-84.6	14.7
Fibra (%)	41.73-65.3	48.1
Fenoles totales (mg EAG/g PS)	8.44-26.7	3.12-94.95
Flavonoides totales (mg EC/g PS)	1.2-2.9	1.65-40.72
Taninos totales (mg EAT/g PS)	0.2-16.5	1.30-25.30

EAG: Equivalentes de ácido gálico; EC: Equivalentes de catequina; EAT: Equivalentes de ácido tánico; PS: Peso seco. Adaptada de: Delgado-Ospina *et al.*, 2021b; Goude *et al.*, 2019; Karim *et al.*, 2014; Rojo-Poveda *et al.*, 2020; Vriesmann *et al.*, 2011.

El chocolate es conocido por su alto contenido de metilxantinas, como la teobromina, por lo que los subproductos de cacao como la vaina no son la excepción. Se ha reportado que el contenido de teobromina en la vaina vacía presenta valores de 1.5 a 4 gramos por kilogramo de vaina seca (Adamafio, 2013). Estos valores se encuentran casi 10 veces por debajo de lo que se obtiene para los granos de cacao fermentados, con valores de 9.79 mg/g (Rojo-Poveda *et al.*, 2020). Con todo lo anterior es importante resaltar que la composición proximal y nutracéutica de la vaina de cacao vacía representa un área de oportunidades para ser aprovechada, pudiendo implementarse dentro de un alimento dirigido para humanos.

La composición proximal de las cascarillas de cacao se presenta en la **Cuadro 1**. Se puede apreciar que, debido al tostado, este subproducto presenta muy baja humedad. El contenido de proteínas y lípidos es alto, con valores del 15 % del peso total, pero el elemento más importante a resaltar es el alto contenido de cenizas siendo principalmente sodio y potasio (Rojo-Poveda *et al.*, 2020). La fibra dietaria puede alcanzar más del 48 %

de los carbohidratos presentes, de la cual, la fibra insoluble representa del 28 hasta el 50 %, y la soluble del 7 al 16 % (Rojo-Poveda *et al.*, 2020). La fibra insoluble se compone de lignina, celulosa, hemicelulosa, y compuestos pécticos, mientras que la soluble de cadenas de pectina (Lecumberri *et al.*, 2007; Redgwell *et al.*, 2003).

Los compuestos fenólicos se relacionan directamente con las propiedades bioactivas de la cascarilla de cacao y el contenido de estos depende de diversos factores entre los que se incluyen la variedad, el genotipo así como las condiciones medioambientales y de fermentación (Botella-Martínez *et al.*, 2021). Se ha reportado la cuantificación de fenoles, flavonoides y taninos totales (**Cuadro 1**), sin embargo, estos valores resultan bastante variables por los factores antes mencionados. Los compuestos fenólicos mayoritarios en la cascarilla son epicatequina y catequina (Botella-Martínez *et al.*, 2021; Rojo-Poveda *et al.*, 2020); sin descartar la presencia de procianidinas B2 y B1, dímeros, trímeros y tetrameros de flavon-3-oles, ácido protocatéico y cafeico (Rojo-Poveda *et al.*, 2020). Cuando los granos de cacao son tostados, una parte de la composición de estos puede llegar a migrar a la cascarilla, entre los compuestos capaces de hacerlo se encuentran las metilxantinas (Botella-Martínez *et al.*, 2021). Con lo anterior se demuestra el potencial de la cascarilla para desarrollarse como un ingrediente funcional, con posibles beneficios ejercidos a la salud del consumidor.

3. Potencial de los subproductos de cacao para ser utilizados en la composición de un alimento

Los subproductos obtenidos a partir del procesamiento del cacao presentan compuestos de importancia biológica que no están siendo totalmente explotados (Campos-Vega *et al.*, 2018). Al desecharse la vaina y cascarilla de cacao durante su procesamiento, se están arrojando a la basura componentes nutricionales relevantes para la salud. Goude *et al.* (2019) sugieren que implementar los subproductos de cacao como parte de un alimento podría ayudar a cubrir los requerimientos diarios de potasio, magnesio y calcio.

Los polifenoles provenientes de cascarilla y de vaina vacía son responsables del 32 y 14 % de la capacidad antioxidante, respectivamente, sugiriendo que su presencia puede ser benéfica al adicionarse a un alimento (Delgado-Ospina *et al.*, 2022). Tanto los flavonoides como sus metabolitos se han relacionado con la prevención de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y obesidad; así como la reducción del riesgo a desarrollar resistencia a la insulina y como coadyuvantes en los tratamientos de aterosclerosis, hipertensión y derrames (Ballard *et al.*, 2019). Lo que da la oportunidad de utilizar un desecho agroindustrial dentro de un alimento con compuestos potencialmente benéficos a la salud.

Por otro lado, la inclusión de fibra dentro de una dieta balanceada puede ejercer beneficios a la salud del consumidor, como reducir el riesgo de infarto, derrames, hipertensión, diabetes, entre otros; mientras que una dieta alta en fibra mejora la química sanguínea, reduce la presión arterial, controla la pérdida de peso e incluso puede funcionar como inmunoregulador (Campos-Vega *et al.*, 2017). La fibra soluble presente en estos subproductos es principalmente pectina, los beneficios de incluirla en la dieta pueden resultar en regularización del colesterol sanguíneo y la microbiota intestinal, producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), actividad antitumoral, entre otros (Tomio, 2018). De esta forma, al desechar la vaina y cascarilla de cacao no solamente se está arrojando a la basura una cantidad importante de compuestos bioactivos, sino también de fibra dietaria con potencial funcional.

b. Los alimentos nutraceuticos pueden ejercer beneficios a la salud de los consumidores

En las últimas décadas, los porcentajes de obesidad y sus comorbilidades han ido en aumento, de forma que la OMS lo ha declarado una epidemia y recalca la importancia de prevenir esta condición por el riesgo de las comorbilidades que se le asocia (OMS, 2020). La creación de ingredientes nutraceuticos y funcionales puede ayudar a regular la prevalencia de obesidad y sus comorbilidades; sin embargo, el consumidor ya no solo busca funcionalidad, la población cada vez se interesa más en que sus alimentos tengan

ingredientes de origen natural (Aschemann-Witzel *et al.*, 2019; Velásquez-Jiménez, 2020). Por lo que, el desarrollo de ingredientes funcionales de origen natural representa un área de oportunidad a desarrollar en la industria alimentaria con creciente importancia y mayor auge cada día.

De acuerdo con la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, un ingrediente se define como cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, que se emplee en la fabricación, elaboración, preparación o tratamiento de un alimento o bebida no alcohólica y esté presente en el producto final, transformado o no. Por su parte, un ingrediente funcional tiene la intención de ejercer un efecto positivo en la salud del consumidor (Kruger *et al.*, 2003). El mercado de los alimentos funcionales ha incrementado su demanda en los últimos años, por lo que la búsqueda de nuevos ingredientes funcionales es uno de los desafíos más importantes de la industria alimentaria (Helkar *et al.*, 2016).

Las moléculas presentes en los extractos naturales son las responsables de llevar a cabo la activación de diversos mecanismos, en el caso de las plantas se destaca la presencia de compuestos fenólicos. Estos compuestos han demostrado tener un rol en la activación de la β -oxidación, ser prebióticos para la microbiota intestinal, estimular el gasto energético por termogénesis, inhibir la diferenciación de los adipocitos, promover la apoptosis del tejido adiposo, incrementar la lipólisis y modificar la sensación de saciedad (Castro-Barquero *et al.*, 2018). Incluir elementos o extractos provenientes de plantas en los alimentos nutracéuticos podría ser una alternativa para ayudar a regular la incidencia de obesidad actual.

Desde hace dos décadas, el estudio de la microbiota intestinal ha tomado relevancia ya que su correcto balance contribuye al estado de salud mientras que la disbiosis puede llevar a enfermedades como la obesidad, diabetes tipo 2, hígado graso no alcohólico, problemas cardíacos, entre otros (Fan *et al.*, 2021). Los AGCC son los principales metabolitos producidos por la microbiota y juegan un papel relevante en el eje intestino-cerebro, afectando rutas inmunológicas, endócrinas, neuronales y hormonales (Dalile *et al.*, 2019). Mejorar la composición y función de la microbiota puede ayudar a mantener el estado de salud, este cambio puede lograrse al modificar la alimentación. Dietas

personalizadas, así como la administración de pre, pro y post bióticos pueden ayudar a mejorar el perfil de la microbiota intestinal (Fan *et al.*, 2021). Por lo que diseñar alimentos destinados directamente a recuperar la composición ideal de la microbiota puede ser un área de oportunidad para mejorar la salud de las personas, así como evitar las comorbilidades asociadas a la obesidad.

c. El ciclo circadiano y su regulación como coadyuvante de enfermedades crónico-degenerativas no transmisibles

La regulación de diversos mecanismos biológicos a lo largo del ciclo del día y la noche es lo que se conoce como ciclo circadiano que depende de un reloj biológico (específicamente un reloj circadiano) y que puede ser afectado por diversos factores. El área de estudio que se encarga de ligar cómo afecta nuestra alimentación al reloj biológico y viceversa es la *crononutrición*. La importancia de la crononutrición ha tendido al aumento en las últimas décadas, ya que la correcta regulación de los ciclos biológicos puede destinarse para combatir ciertas patologías; mientras que un desbalance en los ritmos circadianos puede ocasionar desordenes metabólicos (Arola-Arnal *et al.*, 2019; Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020). De esta manera, existe la posibilidad de mejorar el estado de salud al sincronizar correctamente el ritmo del reloj biológico.

1. El reloj biológico se regula a través de mecanismos específicos, controlados por diversos genes y la hora del día

Los organismos vivos han desarrollado un reloj circadiano, el cual regula los patrones de conducta y rutas metabólicas a lo largo del día (Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020). Tal como se muestra en la **Figura 1**, en la regulación del ciclo existen dos tipos de rutas que pueden ejercer un efecto sobre la conducta, fisiología y el metabolismo, el oscilador central y los periféricos (Cermakian *et al.*, 2000; Dunlap, 1999). El reloj circadiano central se encuentra en el núcleo supraquiasmático (SCN, por sus siglas en inglés) del hipotálamo en el cerebro y controla la ritmicidad del cuerpo, viéndose afectado por estímulos ambientales cíclicos como la luz y oscuridad natural y los cambios ambientales correspondientes,

conocidos como *Zeitbergs* (Zhao *et al.*, 2020). El reloj circadiano funciona mediante genes-reloj que existen en todos los tejidos, fuera del SCN los otros órganos como el hígado, riñón, intestino, tejido adiposo, pulmón y la piel, los genes reloj oscilan muy robustamente a estos tejidos se les conoce como relojes periféricos, los cuales se pueden sincronizar con el reloj central a través de señalizaciones nerviosas u hormonales (Zhao *et al.*, 2020). Además, los relojes periféricos pueden alterarse por estímulos externos como el ciclo de hambre y ayuno a lo largo del día, de modo que los relojes de salida pueden señalizar de salida a otros sistemas y retroalimentar al reloj central (Mohawk *et al.*, 2012).

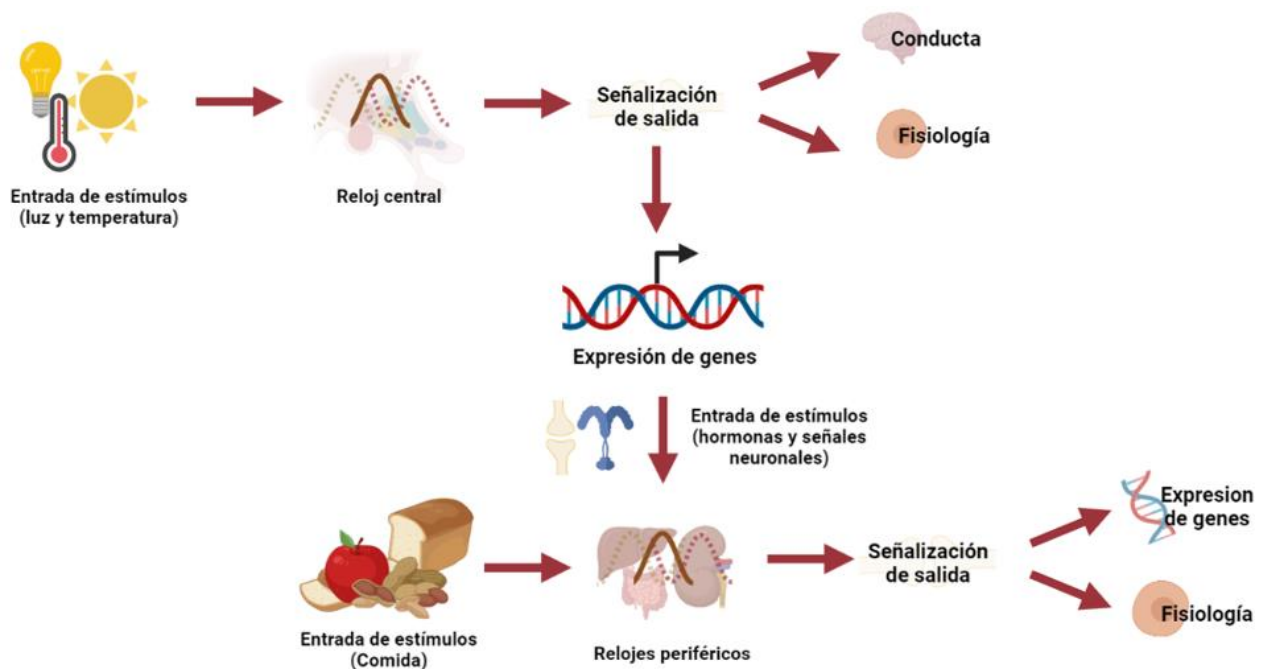


Figura 1. Componentes del reloj circadiano.

Los estímulos del ambiente generan un efecto sobre el reloj central, el cual señaliza de salida para activar efectos conductuales o fisiológicos, o bien activar ciertos genes. Estos genes pueden generar la producción de hormonas y señales nerviosas a los relojes periféricos, que también se estimulan por la entrada de comida, para señalizar la expresión de ciertos genes o fisiologías. Tomado y adaptado de: Zhao *et al.*, 2020.

En la **Figura 2** se muestra la maquinaria genética del reloj molecular. Los genes reloj son aquellos cuyas proteínas son las encargadas de mantener a los ritmos circadianos, en el caso de los mamíferos estas proteínas son CLOCK, BMAL-1, NPAS2, PERs, CRYs, RORs, REV-ERBs, DBP y E4BP4. Existen tres centros de control del reloj biológico donde se llevan a cabo las principales rutas de regulación para este, son conocidos como bucles 1, 2 y 3, donde las proteínas BMAL-1 y CLOCK interactúan para generar las oscilaciones circadianas. En el bucle principal, las proteínas BMAL-1 y CLOCK forman un heterodímero que induce a la transcripción de los tres genes periodo (*Per 1, 2, 3*) y dos genes criptocromo (*Cry 1, 2*), entre otros genes reloj, a través de la E-box (**Figura 2A**) (Zhao *et al.*, 2020). Las proteínas PER y CRY se acumulan en el citoplasma para entrar en el núcleo, donde inhiben la formación del dímero CLOCK-BMAL-1, por lo que la presencia de este heterodímero reprime su propia expresión y la de los demás genes reloj. Cuando las proteínas PER y CRY son degradadas por las quinasas durante la fase nocturna, el heterodímero puede volver a formarse, lo que reinicia el ciclo estando preparado para iniciar de nuevo el día (**Figura 2B**) (Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020). Además de estas interacciones principales, existen otros genes reloj que delimitan el ciclo circadiano.

En los bucles 2 y 3 se generan otras interacciones que afectan la activación de los genes *Bmal1* y *Clock*. En el bucle 2, los receptores nucleares ROR (α, β, γ) activan la transcripción de BMAL-1 al enlazarse con elemento de recepción de ROR (RORE) en el ADN. Por lo contrario, los receptores REV-ERB α y β reprimen la transcripción de BMAL-1 en la misma sección que ROR (Zhao *et al.*, 2020). En el bucle 3, las proteínas DBP y E4BP4 activan y reprimen, respectivamente, a la transcripción de algunos genes en la D-box; además, son antagonistas en la regulación de los genes PER (Mitsui *et al.*, 2001). De manera que, la interacción entre estos factores es la encargada de regular el reloj biológico de los mamíferos.

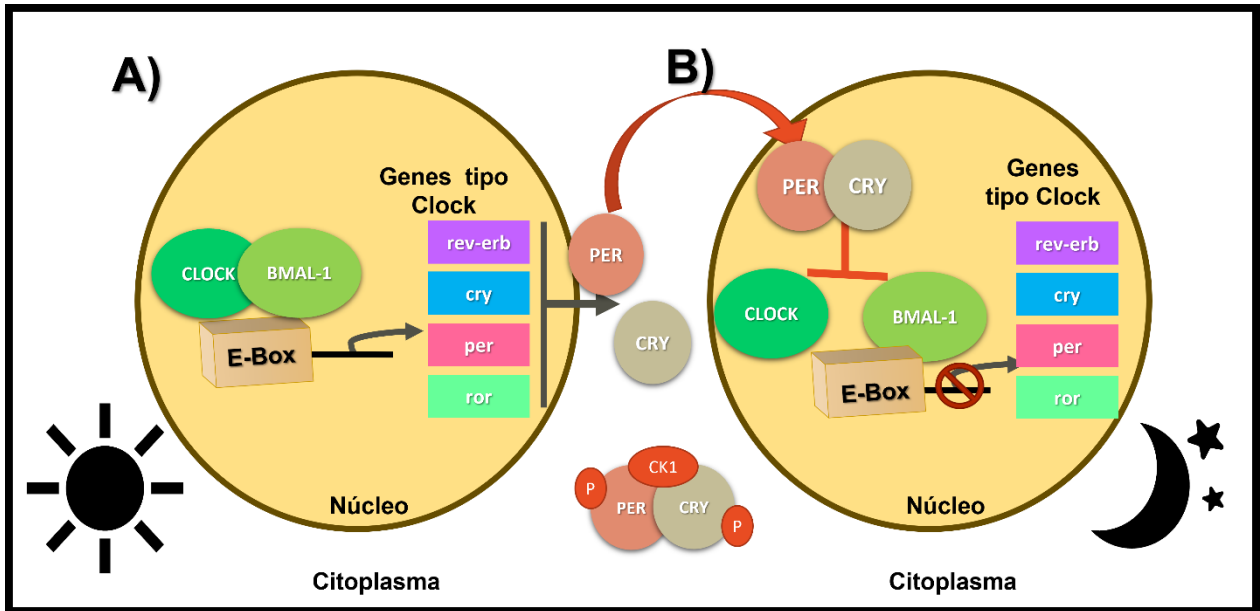


Figura 2. Regulación genética del ciclo circadiano en el bucle 1.

A) Durante el día, la formación del dímero CLOCK-BMAL-1 activa la transcripción de los genes reloj, los que producen a las proteínas PER y CRY. B) Estas proteínas viajan al núcleo para inhibir la formación del dímero, evitando que se sigan transcribiendo los genes reloj. Al caer la noche, las proteínas PER y CRY son degradadas por las quinasas, permitiendo que se reinicie el ciclo. Tomado y adaptado de: Dufoo-Hurtado *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020.

2. Las modificaciones en los genes de reloj llevan a repercusiones en la salud

Algunas modificaciones en la secuencia del gen CLOCK pueden ejercer problemas en la salud, relacionándose con desequilibrios metabólicos. Por ejemplo, polimorfismos del tipo rs4854548, rs3736544, rs1801260, rs11932595 y rs6843722 se asocian con un mayor riesgo a desordenes metabólicos como la obesidad, enfermedad del hígado graso no-alcohólico y síndrome metabólico (Garaulet y Madrid, 2009; Sookoian *et al.*, 2007). Incluso, modificaciones en otros genes puede afectar a la función de CLOCK y, por ende, llevar a repercusiones metabólicas. Por ejemplo, la falta del gen para BMAL-1 puede modificar los ciclos de los niveles para glucosa y triglicéridos, conduciendo al desarrollo de diabetes y obesidad (Garaulet *et al.*, 2010; Harfmann *et al.*, 2016; Marcheva *et al.*, 2010).

Las proteínas PER y CRY son componentes de la sección *negativa* del reloj biológico en los mamíferos y son los encargados de inhibir la formación del dímero CLOCK-BMAL-1. En el sistema nervioso central se pueden encontrar principalmente las proteínas PER 1 y 2, siendo esenciales para la regulación, mientras que la variante 3 es más importante en los relojes periféricos, está reportado modificaciones en este último pueden llevar a fenotipos metabólicos anormales ([Pendergast et al., 2013](#); [Ramanathan et al., 2014](#)). Por lo que una regulación sobre estos podría ser benéfico para prevenir problemas de salud.

3. No todos los ciclos del reloj biológico duran exactamente 24 horas

Si bien el ciclo más relevante es el circadiano cuyo periodo es aproximadamente de 24 horas, existen más ciclos en los organismos que no necesariamente cumplen con esta duración. Aquellos ciclos cuyo periodo es mayor a 24 horas se conocen como “infradianos”, entre ellos la diferenciación y duplicación celular ([Rijo-Ferreira et al., 2019](#)). Dentro de estos, los ciclos que se repiten más de una vez a lo largo del día, o bien, su periodo es menor a 23.5 h se conocen como “ultradianos” ([Aschoff, 1981](#)). Algunos ejemplos de los ciclos ultradianos son la temperatura del cuerpo y el ciclo de hambre/saciedad ([Goh et al., 2019](#)).

El origen de los ciclos ultradianos no está completamente elucidado, sin embargo, se conoce que son regulados desde el sistema nervioso central ([Goh et al., 2019](#)). De acuerdo con [Ballance et al. \(2021\)](#), los ciclos ultradianos cumplen tres funciones: 1) Sincronizar procesos que no se pueden llevar a cabo al mismo tiempo, como el hambre y la saciedad; 2) Comunicación celular, síntesis y liberación de hormonas que permite a las células comunicarse durante el día; 3) Interacción con los ciclos circadianos, un ejemplo sería evitar el hambre cuando permanece un estado de sueño. De manera que los ciclos ultradianos tienen un papel relevante para la regulación del ciclo circadiano y la correcta función del metabolismo.

4. El reloj biológico se puede ver modificado por los compuestos presentes en los alimentos consumidos

Los ciclos de luz y oscuridad a lo largo del día son los principales reguladores del reloj biológico, además de ellos existen otros factores que pueden modificarlo, como serían la ingesta de alimento, el hambre, la digestión y los metabolitos producidos ([Dufoo-Hurtado et al., 2020](#)). De acuerdo con [Zhao et al. \(2020\)](#) la desincronización del ciclo circadiano debido a cambio de turno en el trabajo, desfase horario o pérdida de sueño pueden llevar a consecuencias como diabetes e hipertensión en las personas; además de estos factores, el consumo de alimento en horas inadecuadas, así como los tiempos de alimentación/ayuno pueden ocasionar problemas en la coordinación temporal del reloj biológico. La ingesta de alimento es un regulador de los relojes periféricos, específicamente aquellos en órganos como el hígado e intestino ([Carlberg et al., 1994](#); [Tahara et al., 2014](#)). De manera que, tanto lo que consumimos y la hora del día en que sucede, ejerce un efecto sobre el ciclo circadiano y por ende puede modificar el estado de salud.

Los ritmos biológicos de los organismos vivos son conocidos desde la época de Hipócrates, quien describía las relaciones observadas a lo largo del día y de los años; sin embargo, no fue hasta 1920 que se acuñó el término de “Cronobiología” para referirse al estudio del ciclo circadiano ([Dufoo-Hurtado et al., 2020](#)). Y más reciente aún, resulta la creación del término “Crononutrición” que implica el efecto de los nutrientes sobre el ciclo circadiano y, por consecuencia, el estado de salud; sin embargo, también existe una relación inversa donde la salud puede modificar al reloj biológico ([Aparecida y Carlana, 2019](#)). La relevancia del efecto de los alimentos sobre el ritmo del cuerpo es tal que la crononutrición se ha propuesto como una herramienta para mejorar la fisiología y metabolismo del cuerpo a través del uso de micro y macronutrientes, así como de horarios de alimentación específicos ([Dollet et al., 2019](#)). Por lo que, el reloj biológico podría verse afectado dependiendo de qué compuestos estén presentes en los alimentos

ingeridos, ejerciendo diversos efectos a la salud dependiendo de la hora del día en que fueron consumidos.

5. La desincronización circadiana puede medirse a través de la actividad locomotora

Los relojes biológicos, tanto el central como los periféricos, pueden verse alterados por el estilo de vida ([Zhao et al., 2020](#)), ocasionando un desfase de las variables respuesta con respecto al *Zeitgeber*. La desincronización circadiana también puede darse entre los relojes periféricos y el central y puede conducir a la mala coordinación de procesos metabólicos ([Oosterman et al., 2020](#)). La desincronización entre relojes central y periféricos es conocida como interna, mientras que aquella que es con respecto al *Zeitgeber*, como la luz, se conoce como desincronización ambiental ([Walker et al., 2020](#)). Algunos efectos de la desincronización circadiana incluyen problemas de salud como alteraciones metabólicas, que llevan al desarrollo del síndrome metabólico ([Hernández-García et al., 2020](#)).

Medir la desincronización circadiana en personas es poco preciso ([Oosterman et al., 2020](#)), por lo que es necesario el uso de modelos animales para poder entender y evaluar cambios en conducta y órganos, y poder encontrar relaciones entre estos parámetros. Incluso en animales los métodos para determinar si existe o no la desincronización no son del todo consistentes; por lo que [Brown et al. \(2019\)](#) establecieron algunos parámetros y pruebas para determinar la desincronización. Entre estas pruebas se incluyen el uso de análisis estadísticos como periodogramas, la proporción de actividad durante la fase de reposo, la frecuencia de brotes de actividad y su desfase con respecto al sincronizador (luz). Estos parámetros pueden obtenerse con el análisis de la actividad locomotora, siendo una opción viable el uso de sensores infrarrojos que permitan determinar la actividad de los animales durante un periodo prolongado ([Miranda-Anaya et al., 2021](#)).

6. Las dietas altas en grasa alteran el reloj biológico, con efectos secundarios adversos

Las dietas altas en grasa (DAG) se han utilizado a lo largo de los años como un modelo ideal para someter a los animales a una condición de obesidad y evaluar los efectos de esta sobre el organismo (Collins *et al.*, 2004), ya que no solamente genera el aumento de peso, sino que además tiene cambios metabólicos relacionados con las comorbilidades de la obesidad (Bjursell *et al.*, 2008). En los humanos, la dieta occidental es un estilo de vida caracterizado por el alto consumo de grasas, teniendo repercusiones en la salud como el síndrome de intestino irritable, problemas en la absorción intestinal, alteraciones en la conducta locomotriz, modificaciones en la termogénesis, así como alteraciones en el reloj biológico y su modulación (Rohr *et al.*, 2020). La dieta occidental se compone de entre 35 a 40 % de calorías provenientes de grasa, 43 % de carbohidratos y 17 % de proteínas, además de la presencia de fibra principalmente en forma de celulosa; donde estas calorías provienen del consumo de aceite, lácteos, sacarosa y almidón de maíz (Bjursell *et al.*, 2008).

Existe amplia evidencia del efecto de las DAG sobre el reloj biológico. En ratones, animales nocturnos, las DAG generan que el consumo de alimento durante la fase diurna aumente, lo que provoca alteraciones en la regulación de peso corporal, así como en algunos marcadores circadianos como ROR, hormonas y neurotransmisores de saciedad como leptina, AgRP y NPY (Kohsaka *et al.*, 2007). Además, este tipo de dietas alteran la señalización de la quinasa AMPK, que se activa para las reservas de energía, provocando que exista una desincronización en la expresión de los genes reloj (Woller *et al.*, 2016). En el caso de los humanos, disminuir los carbohidratos en un 15 % para incrementar la grasa en el mismo porcentaje, provoca una alteración en la oscilación en el cortisol circadiano y la expresión de genes relacionados con la inflamación, el metabolismo y los PER en monocitos (Pivovarova *et al.*, 2015).

En un estudio realizado en ratones C57Bl/6J (Bjursell *et al.*, 2008) se encontró que la actividad locomotriz disminuyó de forma aguda, con solo una semana de exposición a una DAG. También se encontraron diferencias en la forma que los nutrientes eran

absorbidos, la velocidad del tránsito intestinal y una mayor tasa de ganancia de peso; los autores atribuyen estos efectos a la poca actividad locomotriz de los animales. En otro estudio similar, donde se utilizaron ratones C57Bl/6J con mutación PERIOD2:LUCIFERASE, el reloj en hígado resultó avanzado en su fase por 5 horas después de solo una semana de exposición a la DAG (Pendergast *et al.*, 2013). En una exposición crónica del mismo modelo, después de cinco semanas, los animales tenían un avance en el reloj del hígado de 4 h, además que perdieron por completo el ritmo de alimentación, distribuyéndolo durante todo el día y no principalmente en la fase nocturna (Branecky *et al.*, 2015).

Los efectos sobre la actividad locomotora en los animales por la exposición a las DAG están relacionados con la expresión de genes del reloj en el sistema músculo esquelético. En animales que consumieron de manera prolongada la DAG, la amplitud de los genes *Clock* en hígado, tejido adiposo y en músculo se vio modificada (Kohsaka *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2017). Además, este tipo de dietas pueden generar distintas respuestas inflamatorias en el sistema músculo esquelético de ratones (Fink *et al.*, 2014; Laker *et al.*, 2017). En el estudio realizado por Budai *et al.*, (2019) se encontró que las personas expuestas a DAG presentaron cambios en la expresión de genes del reloj biológico en el sistema músculo esquelético. La expresión de los receptores transcripcionales de PER 1, PER 3, NR1D1/Rev-erba, y NR1D2/Rev-erbb resultó disminuida; de manera inversa, BMAL-1 y CRY 1 se vieron sobreexpresados por la exposición a las dietas altas en grasa (Budai *et al.*, 2019).

Esta evidencia indica que las DAG modifican el reloj biológico desde un nivel genético, repercutiendo el funcionamiento de diversos órganos. Los efectos de esta dieta se pueden ver en los organismos aún con periodos cortos de exposición al alto contenido de grasas; pero de la misma manera, volver a dietas normales y restringir el consumo de calorías provenientes de las grasas puede revertir estos efectos en el organismo. Por lo que la desincronización en el reloj biológico ocasionada por la DAG puede revertirse en si se hace uso de una dieta balanceada; Rohr *et al.*, (2020) sugieren el uso de terapias a

través de la dieta ya que resulta más barato, no hay efectos secundarios y puede adaptarse al paciente.

7. Los compuestos fenólicos ejercen un efecto sobre el reloj biológico

El efecto de los compuestos fenólicos sobre el ciclo circadiano es un tema de investigación reciente y representa un área de oportunidades para obtener información novedosa. Su actividad sobre el ciclo circadiano podría ser explicada por todas las transformaciones que sufren después de ser consumidos y los órganos donde son depositados, incluso, esto podría explicar la extensa variabilidad que hay entre individuos respecto a su efecto (Ávila-Román *et al.*, 2021). El estudio de estos compuestos sobre el ciclo circadiano mostró recientemente que pueden modular a nivel molecular los miRNAs, actividad enzimática y generar modificaciones epigenéticas que alteran diferentes rutas de señalización (Pan *et al.*, 2013).

La administración de alimentos ricos en proantocianinas puede regular los genes *Bmal1* y *Nampt* tanto en el hipotálamo, como en hígado, intestino y tejido adiposo de manera dosis dependiente en ratas con dietas altas en grasa (Aragonès *et al.*, 2016; Casanova *et al.*, 2014; Ribas-Latre *et al.*, 2015a; Ribas-Latre *et al.*, 2015b). Debido a su actividad en conjunto o como parte de un alimento, también se ha investigado el efecto de los compuestos fenólicos de manera aislada o específicos sobre el reloj biológico. Cuando se ha utilizado el galato de epigallocatequina de forma aislada se demuestra su capacidad para disminuir las alteraciones relacionadas con la obesidad y sus comorbilidades ya que sincronizan los periodos de los genes reloj como *Clock*, *Bmal1* y *Cry1*, por la regulación de los niveles de *Sirt1* y *PGC1 α* en hígado y tejido adiposo blanco (Mi *et al.*, 2017).

Un punto medio entre tener el alimento completo y el compuesto aislado podrían ser los extractos fenólicos provenientes de diferentes matrices alimentarias, como es el caso del extracto de semilla de uva, conocido como GSPE por sus siglas en inglés. El GSPE puede modular los genes del reloj biológico en el hígado de forma dependiente al

momento del día en que se administra, ya que a las 12 horas del día incrementa la acetilación de BMAL-1 (Ribas-Latre *et al.*, 2015b). En el mismo estudio se encontró que puede modular los niveles de la enzima nicotinamida fosforibosil transferasa reduciéndola durante el día y aumentándola durante la noche, lo que podría explicarse como que el patrón nocturno de acetilación de BMAL-1 es alterado por la ingesta de GSPE. Al administrarse el mismo extracto durante el día a ratones, este produjo modificaciones en los niveles de melatonina diurna, retrasando la disminución de esta; también se encontró que pueden ocasionar cambios en la oscilación de BMAL-1 y *Nampt* en el hipotálamo (Ribas-Latre *et al.*, 2015a). Por lo que los extractos provenientes de algunos subproductos agroalimentarios, como la semilla de uva, también contienen compuestos con la capacidad de generar efectos sobre el reloj biológico.

Otros compuestos fenólicos con estructura no flavonoide, como el resveratrol, también tienen un efecto sobre el reloj biológico. Esta molécula fue evaluada respecto a su capacidad de revertir la desincronización del metabolismo de lípidos, modificando la expresión y restaurando la ritmicidad tanto de los genes del reloj en general *Clock*, *Bmal1*, *Per2* y *Rev-erba*, como los específicos del metabolismo de lípidos en tejido adiposo blanco (Miranda *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2015). Sin embargo, sus efectos benéficos dependen de la hora del día en que es administrado, ya que al darse en ratas durante su fase nocturna puede actuar como un antioxidante; al contrario, cuando se administra durante la fase diurna este puede actuar como un agente prooxidante, lo que sugiere que se produjeron cambios en los niveles de superóxido dismutasa por la suplementación (Murray *et al.*, 2019). Por lo que no solamente los flavonoides ejercen un efecto, si no que otras estructuras fenólicas también tienen la capacidad de alterar el estado de salud.

Otro tipo de compuestos fenólicos son los ácidos fenólicos, que se caracterizan por tener el anillo aromático, los grupos hidroxilo y al menos un grupo carboxílico. Estos también pueden modificar el ciclo circadiano, como el ácido chicórico y cinámico quienes modifican a la proteína BMAL-1 así como la amplitud del periodo circadiano para tratar el hígado graso y la conducta de los animales de experimentación (Guo *et al.*, 2018; Oishi *et al.*, 2017). La actividad del ácido chicórico como cronobiótico se relaciona con su

capacidad de reprimir la ruta p-Art/Akt y elevar los niveles de enzimas del metabolismo de lípidos y los mRNA correspondientes (Guo *et al.*, 2018). Entonces, todas las clasificaciones de los compuestos fenólicos pueden modificar el reloj biológico, lo que abre un área de oportunidades para la exploración del efecto de alimentos ricos en estos y con un perfil variado de los mismos.

Estos estudios muestran la capacidad de los compuestos fenólicos como parte de un alimento, extracto o aislados para sincronizar el reloj circadiano y tratar algunas patologías, por lo que es área de oportunidad para llevar a cabo más investigaciones sobre esta. Además de los compuestos fenólicos, existen otros que pueden llegar a modificar la amplitud y expresión de los genes reloj. Tal es el caso de los compuestos obtenidos en el metabolismo de la microbiota intestinal ya sea por el consumo de fibra o de compuestos fenólicos.

8. La microbiota intestinal ejerce un efecto directo sobre los genes reloj

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que habitan el tracto intestinal, conformado por hasta 1000 especies bacterianas que representan alrededor de 10 trillones de células (Liang *et al.*, 2017; Schmale *et al.*, 2020). La presencia de estos microorganismos puede ayudar al hospedero a conservar la estructura de la mucosa intestinal, luchar contra patógenos, activar el sistema inmune, fermentar la fibra dietaria, sintetizar vitaminas, metabolizar proteínas y metabolizar xenobióticos (Schmale *et al.*, 2020). El metabolismo de las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal también se relaciona con la producción de moléculas como neurotransmisores, citocinas, serotonina, dopamina, AGCC, melatonina y ácido gama-aminobutírico (Mazzoli *et al.*, 2016). Debido al papel que tiene la microbiota intestinal en el metabolismo del hospedero, no es de sorprender que esta pueda modificar los ritmos biológicos.

Los modelos animales con intestino libre de bacterias son una herramienta ampliamente utilizada para poder estudiar el efecto de la microbiota sobre el funcionamiento del organismo. Se ha reportado que la falta de microbiota intestinal en un

modelo de ratones puede ocasionar que la amplitud de los genes de los relojes central y periféricos se vea disminuida, aun cuando existe la influencia de los ciclos de luz y oscuridad a lo largo del día (Leone *et al.*, 2015). Estos efectos se han visto representados en expresiones reducidas de *Bmal1* y *Cry*, así como el aumento en la expresión de *Per1* y *Per2* en las células intestinales. Además, en el cerebro y el hígado los genes *Bmal-1*, *Clock*, *Per2* y *Cry1* también sufren alteraciones (Ojeda *et al.*, 2016). Esto indica que la presencia de la microbiota intestinal tiene la capacidad de modificar al reloj del hospedero.

La retroalimentación constante entre el hospedero y la microbiota tiene un efecto bien establecido sobre la regulación del ciclo circadiano (Liang *et al.*, 2017). Como la microbiota no usa ciclos de luz/oscuridad como zeitgeber, esta logra ubicarse en ciclo circadiano por la presencia de nutrientes, péptidos y anticuerpos; manteniendo un estado de equilibrio dinámico, que modifica la estructura de la población y, por consiguiente, los metabolitos que se derivan de esta, lo que provoca que se modifiquen los efectos en la fisiología del hospedero a lo largo del día (Leone *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Parkar *et al.*, 2019). Existe evidencia de que las mutaciones en el gen *Clock* pueden ocasionar disbiosis (Voigt *et al.*, 2016), lo que resalta la importancia de la regulación circadiana eficiente para la salud del hospedero. De forma complementaria, las modificaciones en los metabolitos bacterianos pueden llegar a ejercer diversos efectos sobre el organismo, y regula qué se produce y en qué momento del día.

Los diferentes filos y géneros de la microbiota intestinal pueden ocasionar diversas modificaciones en el reloj biológico como consecuencia de la variedad de metabolitos producidos, así como la hora del día en que los sintetizan. Alrededor del 65 % de las bacterias presentes en el intestino se pertenecen a los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, los cuales cambian de abundancia a lo largo del día; los *Bacteroidetes* proliferan durante la fase de descanso debido a que es cuando incrementa la presencia de glucanos en la mucosa intestinal, mientras que *Firmicutes* proliferan durante la fase de actividad, debido al consumo de alimento (Li *et al.*, 2018; Liang *et al.*, 2015; Liang *et al.*, 2017; Parkar *et al.*, 2019). Por lo que la modificación de la abundancia de estos filos es posible a través

de la alimentación, pudiendo traer consecuencias relevantes para el metabolismo del hospedero.

Las bacterias del intestino consumen la fibra presente en la dieta del hospedero para producir metabolitos con efecto biológico. Tal es el caso de los géneros *Lachnospiraceae*, *Eubacteriaceae* y *Ruminococcaceae* que pueden convertirla en monosacáridos, lactato y AGCC como ácido butírico, acético y propiónico (Ojeda *et al.*, 2016; Parkar *et al.*, 2019; Voigt *et al.*, 2016). Otras bacterias pueden sintetizar ácido desoxicólico y quenodesoxicólico, derivados de las sales biliares que disminuyen la expresión de BMAL-1 al incrementar la de PER2 y PER3 en colon, íleon e hígado cuando se administran de manera oral (Govindarajan *et al.*, 2016). Por lo que la modificación de los metabolitos microbianos también puede resultar una herramienta para tratar anomalías en el reloj biológico a través de la suplementación con fibra dietaria.

9. Algunos metabolitos de la microbiota colónica, generados al fermentarse la fibra dietaria, modifican el ciclo circadiano

Como se mencionó, la fibra dietaria puede ser metabolizada por la microbiota, dependiendo de qué microorganismos la digieran, así como la cadena de esta serán los productos obtenidos. La administración de fibra con potencial prebiótico es una oportunidad para incrementar la producción de AGCC, lo que podría resultar en alteraciones benéficas para el ciclo biológico (Tahara *et al.*, 2018). De los ácidos grasos de cadena corta que son producidos por la microbiota intestinal, el más estudiado es el ácido butírico.

La administración de hasta dos gramos de ácido butírico por día a animales de experimentación sin microbiota, incrementa la proporción de RNA mensajero de los genes *Per2* y *Bmal1*, lo que modula los genes reloj en el hígado y sugiere que los tejidos periféricos son los más sensibles a los AGCC (Leone *et al.*, 2015). En modelos de células hepáticas este compuesto puede generar amplitudes más altas en los genes antes mencionados, así como ocasionar un cambio de fase en su expresión (Marcinkevicius *et*

al., 2015). Además, los niveles en sangre de esta molécula oscilan durante el día, mostrando picos máximos a ciertas horas en el día (Ojeda *et al.*, 2016). Tanto el butirato como el propionato pueden inhibir a la histona desacetilasa en hígado, lo que regula la oscilación de las modificaciones de cromatina, por su acceso al hígado vía vena porta en cantidades altas (Leone *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, se inhibe la actividad de SIRT1, que promueve la acetilación de BMAL-1 en el dímero CLOCK-BMAL-1, generando que se suprima la actividad (Schmalle *et al.*, 2020). De forma que controlar la producción de AGCC podría ser una forma de terapia para la regulación del ciclo circadiano y obtener beneficios a la salud.

d. Modificar la expresión de los genes reloj como terapia para regular diversas patologías

Los ciclos del reloj biológico se adaptan al ambiente de los organismos, por lo que pueden ser desincronizados por desfase horario, trabajos de turnos mixtos y otros factores de la vida; esto puede llevar a diversas patologías desde desordenes metabólicos hasta problemas cardiovasculares y cáncer. Existe la creciente necesidad de encontrar estrategias de terapia para corregir la desincronización del ciclo circadiano, a esto se le conoce como cronoterapia y se enfoca en la administración de los compuestos bioactivos a la hora del día en que tengan el efecto potenciado (Ruan *et al.*, 2021). Esto se puede llevar a cabo a través de modificaciones en el estilo de vida, horarios de comida, de sueño y de actividad, buscando el equilibrio perfecto para propiciar la salud circadiana (Schroeder *et al.*, 2013). Entonces, las terapias destinadas a revertir la desincronización del reloj biológico son un área de oportunidad para la investigación de las enfermedades crónico-degenerativas no transmisibles.

Además de considerar hora en la que los compuestos bioactivos deben ser administrados, también es de relevancia considerar la biodisponibilidad de estos. Las características estructurales y la metabolización de cada uno de los compuestos bioactivos afectan la actividad de estos en diversos órganos, por lo que debería considerarse al momento de buscar un efecto en específico. La biodisponibilidad de los

compuestos fenólicos depende de su estructura, metabolización y los componentes de la matriz alimentaria ([Chen *et al.*, 2018](#); [Di Lorenzo *et al.*, 2021](#)). Si bien existe mucha evidencia respecto al efecto de los compuestos fenólicos sobre la salud humana, existe poca acerca de la biodisponibilidad de estos. [Di Lorenzo *et al.* \(2021\)](#) establecieron el orden respecto a la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos, con base a una revisión de la literatura existente, y encontraron que el orden es: ácidos fenólicos > isoflavonas > flavonoles > catequinas > flavanonas, proantocianidinas > antocianinas. Entonces, conocer la composición de la matriz alimentaria y los compuestos bioactivos presentes en esta es relevante para determinar cuál será el compuesto efectivo y hacia qué órgano o tejido se puede dirigir.

Además de la metabolización de los compuestos bioactivos, las características fisiológicas de cada órgano harán que la absorción y permanencia de estos sea diferente. Por ejemplo, los compuestos presentes en el GSPE presentan valores más altos en plasma que en hígado, posiblemente porque en el hígado son metabolizados y ya no pueden encontrarse de forma libre ([Olivero-David *et al.*, 2018](#)). Como la concentración de los compuestos fenólicos y sus metabolitos puede resultar complicado de medir, en ocasiones se opta por medir variables dependientes de esta, como la capacidad antioxidante. [Bariexca *et al.* \(2019\)](#) evaluaron el efecto de los compuestos fenólicos de jugo de arándano y encontraron que estos pueden acumularse en hígado, riñón, corazón, vejiga e incluso en el cerebro y presentar efectos benéficos; además se encontró que, al dar los compuestos aislados, el riñón y la próstata presentaban una mayor biodisponibilidad de estos, seguidos del hígado y el corazón. Por lo que evaluar la presencia de los compuestos bioactivos en estos órganos y tejidos representa una oportunidad para destinar el efecto deseado y que la cronoterapia sea más efectiva al modular específicamente algún reloj periférico.

En el mismo estudio de [Bariexca *et al.* \(2019\)](#) se puede apreciar que el órgano con menor absorción de los compuestos fenólicos, aún en su forma aislada, fue el cerebro. Esto se debe a que la barrera hematoencefálica ejerce el papel de un regulador de acceso a los compuestos xenobióticos para proteger al cerebro. A pesar de esto, algunos

compuestos fenólicos pueden atravesar la barrera hematoencefálica, pero deben cumplir con ciertos requisitos: bajo peso molecular, alta hidrofobicidad, bajo potencial de crear puentes de hidrógeno y estar metabolizados, ya sea en forma metilada, sulfatada o como glucurónidos (Velásquez-Jiménez *et al.*, 2021). De forma que regular el reloj central puede resultar un poco más complejo que modular la sincronización de los relojes periféricos.

Si todos los factores anteriores son considerados, las desincronizaciones en el ciclo circadiano podrían regularse para ayudar a reducir varias de las patologías existentes. Tal es el caso de la obesidad y sus comorbilidades, como ya se mencionó con anterioridad esta se encuentra directamente relacionada con un desbalance en los genes del reloj circadiano. Garaulet *et al.* (2010) encontraron que existe una relación entre los polimorfismos del gen *Clock* y la obesidad, donde específicamente la variación rs1801260 puede potenciar la pérdida de peso si se utilizan estrategias de cambio de alimentación.

e. Los subproductos de cacao tienen potencial para modificar el ciclo circadiano al incluirse dentro de un alimento

i. Adición de la vaina de cacao en alimentos

A pesar de la evidencia de los compuestos bioactivos con potencial funcional encontrados en la vaina de cacao, estos han sido poco estudiados hasta el momento dentro de la misma. Estos compuestos extraídos de la vaina vacía han demostrado su capacidad para inhibir la enzima convertidora de angiotensina, relacionada con el aumento de la hipertensión; así como de inhibir la actividad de la xantina oxidasa, relacionada con la hiperuricemia (Ironi *et al.*, 2019). De forma similar, la pectina presente en la fibra soluble de la vaina de cacao ha sido extraída para su estudio respecto a preparaciones farmacéuticas con el fin de regular la liberación de cortisona en el tracto digestivo; los autores encontraron que un recubrimiento con esta puede mantener una

liberación constante hasta por seis horas, permitiendo que llegue a colon sin sufrir modificaciones (Adi-Dako *et al.*, 2017). De manera que los compuestos presentes en la vaina al ser extraídos pueden generar beneficios a la salud de los consumidores, sin embargo, el uso de la vaina completa ha sido poco estudiado.

Los compuestos bioactivos presentes en vaina son mejor preservados si se da un tratamiento de inactivación enzimática antes de su liofilización y molienda. Además, se evaluaron las propiedades tecnológicas de la harina obtenida, encontrando que tiene altos valores de capacidad de retención de agua y aceite, así como la habilidad de formar y estabilizar emulsiones (Delgado-Ospina *et al.*, 2021b). Posterior a esto, se realizó el único estudio donde se ha adicionado la vaina de cacao a un alimento, siendo utilizada para la reformulación de salchichas frankfurters (Delgado-Ospina *et al.*, 2021a). Aquí se encontró adicionar salchichas con harina de vaina de cacao representó un aumento en la dureza y fuerza necesaria para la mordida; esto se debió a un incremento significativo en la cantidad de fibra en las salchichas, lo que resulta importante ya que este alimento generalmente no presenta valores relevantes de este nutriente.

Por lo anterior, se recomienda el uso de la vaina como sustituto de emulsificantes sugiriendo alimentos producidos por la industria cárnica, con el fin de incrementar el contenido de fibra y de compuestos bioactivos. Los compuestos bioactivos presentes en la vaina, su capacidad antioxidante, alto contenido de fibra y propiedades tecnológicas sugieren explorar su uso íntegro como ingrediente funcional en diversos productos alimentarios. *Debido a que los estudios demuestran que la composición de la vaina puede dirigirse a un fin funcional siendo aceptada por los consumidores y que ha sido muy poco explotada, esta representa un área de oportunidad para su aprovechamiento.*

2. Potencial de la cascarilla de cacao de adicionarse en alimentos

La cascarilla de cacao resulta ser el subproducto más ampliamente estudiado, posiblemente por su similitud en composición, olor, sabor y color al polvo de cacao. Este componente ha sido utilizado en la formulación de diversos alimentos, inclusive del

mismo chocolate, para mejorar sus propiedades tecnológicas, nutricionales y nutraceuticas. Además, sus componentes y extractos han sido probados de manera *in vitro* sobre el estrés oxidativo, sensibilidad a la insulina, función mitocondrial y otros marcadores del síndrome metabólico.

Respecto a su aplicación en alimentos, con el fin de mejorar el perfil nutricional de galletas, [de Barros et al. \(2020\)](#) agregaron harina de soya, banana y cascarilla de cacao en diferentes proporciones, encontrando que todas las formulaciones fueron aceptadas sensorialmente. Las galletas elaboradas con harina de cascarilla tuvieron la cantidad de compuestos fenólicos más alta y aumentó la capacidad antioxidante medida por métodos tanto hidrosolubles como liposolubles. Algo relevante a mencionar es que la cascarilla de cacao también mejoró el perfil nutricional al incrementar el contenido de fibra y minerales de manera dependiente al porcentaje de adición. En las evaluaciones sensoriales se encontró sabor a chocolate cuando la se adicionaba la cascarilla, lo que sugiere que puede utilizarse en la formulación de alimentos relacionados a este sabor con el fin de mejorar el perfil nutricional.

En un estudio llevado a cabo por [Barišić et al., \(2021\)](#) se utilizó la cascarilla de cacao, tratada con descargas eléctricas de alto voltaje y sin tratar, para sustituir una parte del grano de cacao con el fin de maximizar la utilización de los granos de cacao y disminuir los precios. Los autores proponen que adicionar la cascarilla en la composición de los chocolates podría tener aplicaciones industriales ya que presentaron características sensoriales mejores que los chocolates tradicionales. En esta investigación se concluyó que estos chocolates podrían ser clasificados como alimentos nutraceuticos por su alto contenido de fibra, así como la inocuidad regulada a lo largo del proyecto.

La cascarilla también ha sido adicionada en la composición de botanas elaboradas con extruidos de maíz. Este tipo de alimentos tiene un valor nutricional muy bajo, son altos en calorías y pueden generar hábitos de consumo de alimentos inadecuados, por lo que la adición de cascarilla de cacao podría llegar a mejorar la composición de estos ([Jozinović et al., 2019](#)). En general, las propiedades físicas y de expansión de los extruidos no se vieron afectadas por la adición de hasta 15 % de cascarilla de cacao; por

el contrario, si se logró incrementar tanto el contenido de compuestos fenólicos como la capacidad antioxidante de los extruidos, lo que podría dar beneficios extra a los consumidores (Jozinović *et al.*, 2019). Esto demuestra la versatilidad de la harina de cascarilla de cacao para implementarse en alimentos distintos a los comúnmente asociados con el chocolate.

Los compuestos presentes en la cascarilla también han sido evaluados de forma aislada respecto a su capacidad para combatir el estrés oxidativo en modelos *in vitro*. Un extracto de cascarilla compuesto de teobromina, ácido protocatecuico y flavon-3-oles logró disminuir el estrés oxidativo, mantener el potencial de la membrana mitocondrial, reducir la producción de superóxido y radicales mitocondriales, así como incrementar la fosforilación de algunos complejos proteicos relacionados con el aumento de estrés (Rebollo-Hernanz *et al.*, 2021). Esto sugiere el potencial de los compuestos presentes en la cascarilla de cacao para ser utilizados con el fin de generar un beneficio a la salud de los consumidores.

3. Potencial de los compuestos bioactivos de los subproductos de cacao provenientes de otras matrices

Los compuestos bioactivos presentes en algunos alimentos pueden modificar los sistemas fisiológicos para dar beneficios al consumidor; pudiendo relacionarse con la modificación de la sensación de saciedad, así como con la regulación de la amplitud y expresión de genes del reloj biológico. En el caso de los subproductos de cacao, existe un amplio perfil de compuestos bioactivos que no están siendo aprovechados más allá de fertilizar suelos o alimentar al ganado. Si bien la cascarilla y vaina no han sido estudiadas en estos aspectos, estas comparten compuestos bioactivos con otros alimentos o extractos que si han demostrado ejercer un efecto sobre diversos mecanismos de acción.

Los compuestos fenólicos pueden llegar a modificar la amplitud y expresión de los genes del reloj circadiano, siendo los más afectados *Bmal1*, *Per* y *Cry*. Las catequinas

presentes en el té verde, así como los compuestos fenólicos de extracto de semilla de uva y cerezas han demostrado ejercer efectos benéficos en aspectos de regulación del reloj biológico; de forma similar compuestos como el resveratrol y el galato de epigallocatequina modifican la expresión de genes relacionados con el ciclo circadiano (Arola-Arnal *et al.*, 2019). Estos polifenoles también pueden ser encontrados en la vaina y cascarilla de cacao (Karim *et al.*, 2014), sin embargo, no han sido evaluados en ninguno de estos aspectos, lo que abre un área de oportunidad para su aplicación.

Anteriormente se mencionó el potencial de la microbiota y la fibra dietaria para modular diversas patologías relacionadas con el reloj circadiano. El alto contenido de fibra, soluble e insoluble, en los subproductos de cacao podría llegar a modificar los genes reloj por diversas rutas. La fibra presente en estos subproductos podría llegar a mejorar el perfil de la microbiota intestinal de los consumidores, resultando en la síntesis de metabolitos benéficos, como los AGCC que pueden modular al mecanismo del reloj biológico. Asimismo, la fibra proveniente del café usado fue evaluada sobre el ciclo circadiano, donde se obtuvieron resultados positivos al incrementar la actividad locomotriz circadiana en jóvenes adultos (Oseguera-Castro *et al.*, 2019), relacionándose con la producción de AGCC a nivel colónico. De forma que la fibra de los subproductos de cacao está siendo desperdiciada al desecharse sin un fin más allá de la fertilización de suelos, lo que sugiere que se utilicen para darle características nutracéuticas a los alimentos.

VII. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se buscan estrategias para combatir el desperdicio alimentario, organizaciones internacionales han propuesto sistemas escalonados donde aquello que no es aprovechable directamente en la alimentación humana debería transformarse para ser utilizado. La producción de cacao para su comercialización genera subproductos que superan la porción utilizable del fruto, por lo que darles un segundo uso podría reducir el desperdicio alimentario. Los subproductos de cacao tienen una composición rica en compuestos bioactivos como fibra y compuestos fenólicos que no están siendo completamente aprovechados.

Los compuestos fenólicos y la fibra ya han demostrado ejercer efectos benéficos sobre diferentes patologías, entre las cuales se encuentra la desincronización de los relojes biológicos. El reloj biológico es un mecanismo estrictamente regulado por genes y factores de transcripción cuya desincronización puede llevar a diversas repercusiones en el estado de salud; estas patologías se relacionan con diversos factores, incluidas las dietas altas en grasa que modifican los genes del reloj biológico pero que podrían prevenirse si se modulan los mecanismos de regulación con terapias específicas.

Los compuestos presentes en los subproductos del cacao, pero provenientes de otras matrices, se han probado sobre estos parámetros, obteniendo resultados prometedores y abriendo el panorama para su estudio sobre esta matriz. Además, si sumamos las propiedades tecnológicas, como la capacidad de retener agua, de estos subproductos es posible pensar en su utilización como un ingrediente tecnológica y nutraceuticamente funcional con capacidad de modificar la sensación de saciedad y modular el ciclo circadiano. Lo anterior demuestra el potencial de los subproductos de cacao para ser utilizados en la formulación de un ingrediente funcional con el fin de revertir la desincronización circadiana ocasionada por una DAG.

VIII. HIPÓTESIS

La combinación de vaina y cascarilla de cacao generan una harina alta en fibra con compuestos fenólicos biodisponibles que generan cambios favorables en el ritmo de la actividad locomotora y modulan la expresión de genes del reloj biológico en hígado, tejido adiposo, intestino delgado y cerebro en un modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa.

VII. OBJETIVOS

a. Objetivo General

Desarrollar un ingrediente funcional alto en fibra y compuestos fenólicos, formulado a partir de la combinación de vaina y cascarilla de cacao, y evaluar su efecto sobre el ritmo de actividad locomotora y la modulación del reloj biológico en hígado, tejido adiposo, intestino y cerebro en un modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa.

b. Objetivos específicos

1. Diseñar y caracterizar química y nutracéuticamente un ingrediente a base de vaina y cascarilla de cacao con compuestos fenólicos y fibra dietaria.
2. Determinar si el ingrediente desarrollado a base de vaina y cascarilla de cacao tiene un efecto sobre el consumo de alimento, parámetros morfológicos y actividad locomotora en un modelo murino desincronizado a través de una dieta alta en grasa.
3. Determinar si los cambios ocasionados por el ingrediente desarrollado tienen impacto en la expresión de los genes *Bmal1* y *Per2* en hígado, tejido adiposo, intestino delgado e hipotálamo en dos tiempos del día.
4. Evaluar cambios en el metabolismo endógeno respecto a compuestos bioactivos y sus metabolitos en hígado, tejido cerebral no-hipotalámico y plasma en un modelo de ratones desincronizados a través de una dieta alta en grasa.

VIII. METODOLOGÍA

a. Etapa 1: Diseño y caracterización del ingrediente de cacao

Como producto de esta primera etapa se obtuvo el artículo original titulado: “*Design and characterization of a solid-state fermented cacao pods and husk-based functional ingredient to potentially modulate circadian rhythm-associated proteins*”. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103199>. Esta etapa corresponde al primer objetivo específico: Diseñar y caracterizar química y nutracéuticamente un ingrediente a base de vaina y cascarilla de cacao con compuestos fenólicos y fibra dietaria.

1. Materias primas, su procesamiento y caracterización

Los frutos de cacao orgánico de la especie *Theobroma cacao*, variedad criollo, fueron recolectados en estado de madurez óptimo en el municipio de Jalpan de Méndez en el estado de Tabasco en la cosecha de octubre-noviembre 2021 (18°14'17"N, 93°13'09"O). Se enviaron a la Universidad Autónoma de Querétaro y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. La cascarilla de cacao fue enviada ya tostada después de que los granos de cacao obtenidos en la plantación fueran fermentados y tostados con el método tradicional en una empresa chocolatera. Los frutos fueron lavados y desinfectados manualmente con una solución de hipoclorito de sodio al 2% para ser cortados de manera transversal y dejar expuestos los granos, el mucílago y la placenta. Se retiraron los granos de cacao, la placenta y el mucílago con el fin de dejar solamente la vaina vacía, los granos y mucílagos se destinaron al procesamiento de chocolate tradicional. El diagrama completo del procesamiento y caracterización de las materias primas aparece en la **Figura 3**.

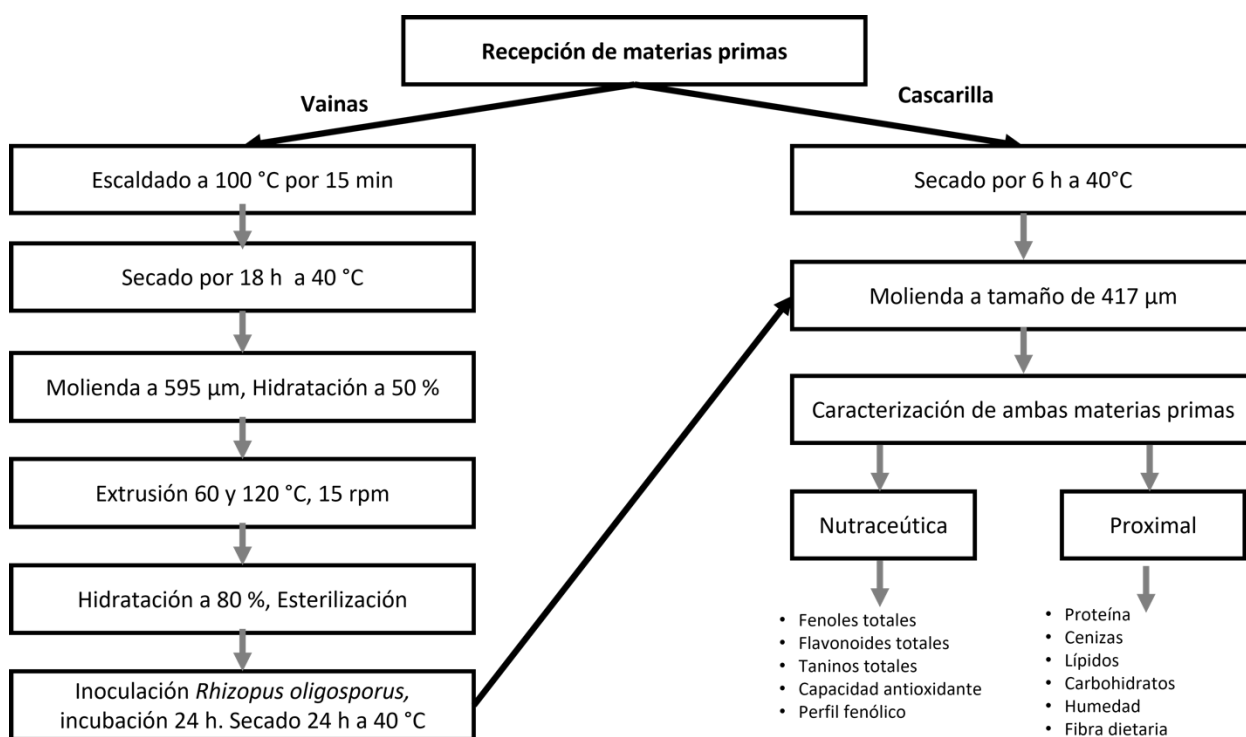


Figura 3. Diagrama de procesamiento para las materias primas.
Del lado izquierdo se muestra el procesamiento para la vaina, del derecho la cascarilla.

Una vez obtenidas las vainas de cacao se sometieron a un tratamiento de inactivación enzimática propuesto por [Delgado-Ospina et al. \(2021b\)](#). Para ello las vainas se cortaron en trozos de 1.5 cm de ancho y se colocaron en agua hirviendo durante 10 min, al terminar se enfriaron y molieron con un molino de grano para congelarse hasta su procesamiento. El procesamiento de las vainas vacías se llevó a cabo de acuerdo con lo anteriormente reportado por nuestro grupo de trabajo con algunas modificaciones ([Mendoza-Zamorano, 2022](#)). La pasta obtenida se extruyó en un prototipo con un tornillo de 45 con diámetro de 2.54 cm y dos zonas de calentamiento de 15 y 10 cm. Las condiciones son: 15 rpm y 1.1 mm diámetro del dado, la primera zona de calentamiento se ajustó a 60 °C y la segunda a 120 °C. Posteriormente, se llevó a cabo una fermentación con *Rhizopus oryzae* adaptando el método de preparación de TEMPEH MX ® y las condiciones de [Lateef et al. \(2008\)](#). Para ello, la muestra extruida se hidrató por dos horas hasta obtener un porcentaje de humedad del 80 % v/v y se colocó en autoclave por 20 min a 121 °C, se

dejó enfriar a temperatura de 30 a 35 °C y se inoculó con el cultivo iniciador (1 g cultivo iniciador/200 g de muestra). Se incubó a 30-34 °C en bolsas de plástico con orificios durante 24 horas en ausencia de luz con humedad relativa del 50 %. Se verificó la formación del micelio y la cobertura de este sobre la vaina para proceder a secar la muestra a 40 °C por 24 h para la inactivación del hongo y su posterior molienda.

Los subproductos ya secos se molieron para formar harinas. El tamaño de partícula se decidió de acuerdo con Botella-Martínez *et al.* (2021), quienes sugieren que un diámetro menor a 417 µm propicia las mejores condiciones de contenido de compuestos bioactivos. Después de obtener las harinas, estas se almacenaron al vacío y congeladas a -20 °C hasta su uso y caracterización.

La caracterización química consistió en humedad (925.23), proteína (920.105), lípidos (920.39), cenizas (945.46) y perfil de fibra (991.43). Los subproductos también fueron caracterizados en su composición nutraceútica incluyendo fenoles (Singleton *et al.*, 1999), taninos (Feregrino-Pérez *et al.*, 2008), flavonoides totales (Oomah *et al.*, 2005) y melanoidinas (Iriando-DeHond *et al.*, 2020), así como su capacidad antioxidante por cuatro métodos diferentes: DPPH (Fukumoto & Mazza, 2000), ABTS (Nenadis *et al.*, 2004), FRAP (Benzie & Strain, 1996), ORAC (Dávalos *et al.*, 2004) y un perfil de compuestos bioactivos por HPLC (Sánchez-Quesada *et al.*, 2023). Con el fin de establecer algún destino industrial, se evaluaron propiedades tecno-funcionales (Fernández-López *et al.*, 2018; Chau and Huang, 2004; Delgado-Ospina *et al.* 2021a) que incluyen la capacidad de retención de agua, de aceite, formación de emulsiones y espumas, entre otras. (Velásquez-Jiménez *et al.*, 2023).

2. Diseño y caracterización del ingrediente funcional de subproductos de cacao

Una vez caracterizados cada uno de los subproductos se procedió a realizar la mezcla correspondiente para la obtención del ingrediente funcional. El diseño de mezclas a utilizar fue del tipo regular con dos factores de mezcla, por lo que los porcentajes de cascarilla y vainas sumaron el 100 % y se presentan en el Cuadro 2. Los valores teóricos

para el diseño de mezclas se tomaron de acuerdo con la composición de los subproductos de cacao. Para el análisis estadístico del diseño se utilizó Minitab 16. Se realizaron las pruebas de caracterización anteriormente mencionadas a las mezclas diseñadas con el fin de comparar cómo afecta la adición de cada una de las materias primas.

Cuadro 2. Diseño de mezclas para la formulación del ingrediente de subproductos de cacao.

Diseño	Vaina (%)	Cascarilla (%)	Fibra teórica (g/100g)	Flavonoides teóricos mg EC/g PS
1	50	50	50.75	11.64
2	33	66	49.83	14.81
3	66	33	51.66	8.47

3. Análisis estadístico de la Etapa 1

Los resultados de esta etapa son expresados como media \pm error estándar de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una prueba pos-hoc de Tukey-Kramer con un nivel de significancia del 5 %. Se realizó también un análisis de componentes principales para cuantificar las variables y los compuestos responsables con una correlación de Spearman.

b. Etapa 2: Modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa

Esta etapa corresponde al objetivo específico número 2: Determinar el efecto del ingrediente desarrollado a base de vaina y cascarilla de cacao sobre el consumo de alimento, parámetros morfológicos y actividad locomotora en ratones con una dieta alta en grasa.

1. Estructuración del modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa

El modelo murino se desincronizó por efecto de una dieta alta en grasa, de acuerdo con la metodología propuesta por [Han et al., \(2021\)](#). Se obtuvieron 48 ratones C57/Bl6J machos de 12 semanas de edad que se obtuvieron del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El bioensayo se llevó a cabo en el bioterio del laboratorio de cronobiología en la Unidad Multidisciplinaria de Docencia e Investigación, en la Facultad de Ciencias de la UNAM, campus Juriquilla. El ensayo fue dividido, de acuerdo con el fotoperiodo utilizado, en tres etapas: fotoperiodo estándar de 12:12 h (luz:oscuridad) durante 10 semanas, oscuridad constante por dos semanas y dos semanas de resincronización con fotoperiodo estándar de 12:12 h. Las condiciones de alojamiento fueron humedad relativa del $55 \pm 15 \%$ y temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Los ratones fueron colocados en jaulas individuales de acero inoxidable de 97 cm^2 que permiten la entrada de luz y la circulación de aire. Los animales se aclimataron a las condiciones de laboratorio, procedimientos y personal durante una semana donde recibieron agua y comida *ad libitum* (Dieta Rodent Chow A5001). El lavado de bebederos, comederos, pisos y charolas de recolección se realizó de manera semanal, así como la limpieza de las jaulas. Todos los procedimientos se realizarán de acuerdo con las Regulaciones Federales para la Experimentación y Cuidado de Animales (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999 México) y al Comité de Bioética de la Facultad de Química (UAQ) (No. de oficio. **CBQ22/017b**). En caso de existir algún tipo de efecto secundario negativo como pérdida de peso excesiva, diarrea o vómito, se retiraría el tratamiento experimental.

Una vez pasada la semana de aclimatación, los animales se dividieron aleatoriamente en uno de los cuatro grupos y se procedió a realizar el bioensayo durante las semanas correspondientes. El número de ratones por grupo fue de 12, y al final de bioensayo fueron divididos en dos subgrupos, con el fin de saber de qué manera cambia la expresión genética durante las fases diurna y nocturna. El número total de ratones por subgrupo fue de seis, suficientes ejemplares para obtener una validación estadística. Los grupos fueron los siguientes:

- **Grupo 1:** Dieta estándar (Control sano)

- **Grupo 2:** Dieta estándar adicionada con ingrediente de cacao al 6 % (Tratamiento sano)
- **Grupo 3:** Dieta alta en grasa (Control desincronizado)
- **Grupo 4:** Dieta alta en grasa con ingrediente de cacao al 6 % (Tratamiento desincronizado)

El acceso a la comida y el agua fue *ad libitum*. Una vez a la semana se registró el consumo de alimento de 24 horas, con el fin de intervenir lo menos posible en el comportamiento de los animales. Se llevó a cabo un registro del crecimiento de los ratones para conocer el efecto de la dieta y desincronización sobre el peso corporal. Los animales fueron pesados al inicio del bioensayo y una vez a la semana al ZT=3 hasta completar las catorce semanas de bioensayo. El registro de peso se presenta como promedio \pm error estándar de los doce ratones por grupo.

La composición de las dietas se presenta en el Cuadro 3. El ingrediente de cacao fue adicionado en una suplementación del 6 % mientras que la manteca vegetal se agregó hasta obtener el 50 % de las calorías provenientes de la grasa, simulando una dieta occidental. Las dietas fueron caracterizadas respecto a su composición química y nutracéutica utilizando las mismas metodologías de la **sección a.i.** correspondiente a la caracterización de los subproductos y mezclas diseñadas ([Herrera et al., 2023](#)).

Cuadro 3. Composición de las dietas utilizadas en el bioensayo.

Dieta	Calorías (Kcal/g)	Composición (g/100g)				
		Dieta estándar	Ingrediente de cacao	Manteca	Vitaminas*	Minerales**
Estándar	2.92	100	N/A	N/A	N/A	N/A
Estándar +	2.87	94	6	N/A	N/A	N/A
Ingrediente						
Alta en grasa	4.02	81	N/A	19	0.004	0.017
Alta en grasa + Ingrediente	3.95	76	6	18	0.004	0.017

Los valores son por cada 100 g de dieta. N/A: No aplica. *: AD-HOC MIX® Premezcla Vitaminas América. Código VIM0013. Versión: 24522. **: AD-HOC MIX® Premezcla Minerales América. Código: VIM0010. Versión: 18321. Dieta basada y modificada de: [Herrera et al., \(2023\)](#).

El procedimiento para la elaboración de las dietas se presenta en la **Figura 4**. Las dietas se elaboraron de acuerdo con las normas de higiene para preparación de alimentos establecidas en la NOM-251-SSA1-2009. El primer paso fue pesar los ingredientes secos de acuerdo con el Cuadro 3 y se mezclaron con una mezcladora de motor rotatorio durante tres minutos. En el caso de las dietas altas en grasa, se adicionó la manteca derretida y se mezcló de forma manual. Posteriormente a las dietas se les adicionó agua con el fin de volver a formar pellets, para las dietas altas en grasa la adición de agua fue del 50 % del peso de la mezcla total, mientras que las dietas estándar el 100 % del peso. Una vez formados los pellets, estos se deshidrataron a 40 °C por 72 h hasta obtener pellets a humedad constante. Los pellets elaborados se almacenaron en refrigeración hasta por tres semanas.



Figura 4. Diagrama de la elaboración de dietas.
 *Indica adición de manteca en caso de que la formulación lo requiera.

2. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad locomotora en un modelo murino

Los cambios en la actividad locomotora, como medida de la desincronización, se evaluaron con el registro de la actividad general. Para ello se siguió la metodología establecida por [Miranda-Anaya et al., \(2021\)](#), se colocaron interruptores infrarrojos a los lados de las jaulas y se conectaron a una computadora que registró y sumó los movimientos cada 10 min. Para el fotoperiodo regular (12:12 h) se determinó la actividad promedio durante el día, noche y total. La actividad en la fase de oscuridad constante fue base para el cálculo el periodo del ritmo circadiano de actividad locomotora. Se registró además el inicio de actividad con respecto al apagado de luces y se analizaron los ciclos ultradianos como señal de estabilidad del ritmo circadiano mediante el periodograma de Lomb-Scargle. Los resultados fueron analizados con los programas ImageJ (plug in, Actogram J) y Actiview.

3. Eutanasia y recolección de muestras biológicas

Una vez concluidas las catorce semanas de bioensayo los animales fueron eutanizados por decapitación para colectar los órganos. Se tomaron muestras a dos diferentes horas en ZT6 y Z18 con el fin de evaluar cambios por el día y noche en la expresión de genes de reloj y cambios en el metaboloma endógeno ([Han *et al.*, 2021](#)). La sangre fue colectada en tubos heparinizados. Se colectaron el hígado, cerebro, íleon y tejido adiposo epididimal. Además, se recolectaron las heces de los animales 24 h antes del sacrificio. Los tejidos, plasma y heces se mantuvieron en congelación a -80 °C hasta su análisis.

Respecto al desecho de los residuos peligrosos biológico-infecciosos una vez terminado el bioensayo, se trataron según lo estipulado en la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Las jeringas utilizadas se colocaron en un recipiente rojo de polipropileno especial para objetos punzocortantes con una leyenda que indique “residuos punzocortantes biológico-infecciosos” por un periodo máximo de 15 días hasta su recolección por la empresa Servicios Especializados en Residuos S.A. de C.V. El material quirúrgico utilizado se remojó en cloro por 12 h, se lavó y se esterilizó para su posterior almacenamiento. Los restos de los ratones no requeridos para el estudio se almacenaron a -20 °C en una bolsa grande color amarillo, sin rebasar el 80 % de su capacidad, dicha bolsa se rotuló con la leyenda “desechos patológicos” y se almacenará por un periodo máximo de 15 días hasta su recolección por la empresa.

4. Análisis estadístico para el modelo murino

El análisis estadístico de la etapa dos fue diferente para cada fotoperiodo correspondiente. En el caso de las primeras 10 semanas de L:D 12:12, se realizó un análisis de actividad total y en cada fase, usando un ANOVA de una vía con prueba de Tukey-Kramer para diferencias significativas ($p < 0.05$). Para el fotoperiodo de oscuridad constante se realizó la medición del periodo usando un periodograma de Lomb-Scargle con significancia del 5 %, una vez calculado el periodo promedio se realizó un ANOVA y prueba de Fischer como análisis pos-hoc. Los análisis de inicio de actividad y ciclos

ultradianos se trataron con estadística descriptiva. Todas las pruebas fueron realizadas en el software Minitab ® versión 16.

c. Etapa 3: Evaluaciones ex-vivo a los tejidos colectados del modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa

Esta etapa corresponde a los objetivos específicos 3 y 4: 3) Determinar cambios, ocasionados por el ingrediente desarrollado, en la expresión de los genes *Bmal1* y *Per2* en hígado, tejido adiposo, intestino delgado e hipotálamo en dos tiempos del día. 4) Evaluar cambios en la biodisponibilidad de compuestos bioactivos y sus metabolitos en hígado, cerebro y plasma en un modelo murino desincronizado a través de una dieta alta en grasa.

1. Perfil lipídico y glucosa sanguínea

Para el perfil químico sanguíneo de los animales se utilizaron los equipos instantáneos “Lipidocare sd” (SDB-ST11003, SD Biosensor) y accu-chek ®, para perfil lipídico y glucosa en sangre respectivamente. En el caso de *Lipidocare sd*, se utilizaron 3 gotas de sangre, recolectada al momento del sacrificio (ZT6 y ZT18) y se reportó colesterol total, triglicéridos totales, colesterol HDL, colesterol LDL y colesterol no-HDL. Para cuantificar la glucosa en sangre se utilizó una gota de sangre recolectada al momento, en los dos tiempos de sacrificio, y se reportó como glucosa sanguínea. Los resultados se expresan en mg/dL.

a) Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media \pm error estándar de al menos cinco replicas biológicas. El análisis estadístico consistió en un ANOVA de una vía considerando a cada grupo en un solo tiempo de eutanasia (ZT6 o ZT18). En caso de existir diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). Las comparaciones entre el tiempo de eutanasia (ZT6 y ZT18) se realizaron con una prueba de t^* de student ($p < 0.05$).

2. Cuantificación de la expresión de los genes del reloj en órganos y tejidos

Se cuantificó la expresión de genes del reloj (*Per2* y *Bmal1*) en hígado, tejido adiposo epididimal, ileon e hipotálamo. Además, en hígado se midió la expresión de un gen controlado por reloj (*PPAR α*) solamente en hígado. Para ello se realizó la extracción de RNA, posteriormente una retrotranscripción para obtener el cDNA y concluir con medir la expresión del gen por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

La extracción de RNA se llevó a cabo con el protocolo de TRIzol reagent, siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, USA), tomando 30 a 50 mg de tejido con 1 mL de TRIzol, a excepción del tejido adiposo que se adicionaron 1.5 mL. El RNA obtenido se resuspendió en agua (15-80 μ L dependiendo del tejido). Se cuantificó el RNA obtenido por medio de un Nanodrop® Lite Plus (Thermo-Scientific, USA). Seguido a esto, se ajustó la concentración de RNA a 1 ng y se realizó la retrotranscripción a cDNA con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription con inhibidor de RNasa (Applied Biosystems, USA).

Una vez obtenido el cDNA se realizó la cuantificación de la expresión relativa de genes de reloj *Per2* y *Bmal1* vía qPCR-RT. Se utilizó un termociclador Real-Time PCR System, Applied Biosystems StepOne™. Se preparó una mezcla de reacción con KAPA SYBR® FAST qPCR, Master Mix y los oligonucleótidos cebadores correspondientes siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó el gen *B2m* para calcular la expresión relativa de los mRNA calculando la media geométrica y el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los detalles de los oligonucleótidos utilizados aparecen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Características de los oligonucleótidos utilizados para la qPCR-RT de los genes reloj y el gen constitutivo

Gen	Secuencia	Tm (°C)	Concentración (mM)	Referencia
Bmal1	Foward:	67	500	(Escalante-Covarrubias et al., 2023)
	CCAAGAAAGTATGGAC			
	ACAGACAA A			
	Reverse:			
	GCATTCTTGATCCTTC			
	CTTGGT			
Per2	Foward:	65	500	
	GGCTTCACCATGCCTGTT			
	GT			
	Reverse:			
	GGAGTTATTTTCGGAGGCA			
	AGTGT			
PPARα	Foward:	63	400	
	ACAAGGCCTCAGGGTAC			
	CA			
	Reverse:			
	GCCGAAAGAAGCCCTTAC			
	AG			
B2m	Forward:	63	400	
	GGTCTTTCTGGTGCTTGT			
	CTCA			
	Reverse:			
	GTTTCGGCTTCCCATTTC			
	TCC			

a) Análisis estadístico

Los resultados se muestran como media \pm error estándar de al menos cinco replicas biológicas. El análisis estadístico de la expresión relativa de genes de reloj consistió en un ANOVA de dos vías, considerando los siguientes factores: 1) Dieta administrada (STD, STD + Ing, HFD o HFD+Ing) y 2) hora de eutanasia (ZT6 o ZT18). En caso de existir diferencias significativas se aplicó una comparación de medias por prueba de Tukey-

Kramer con un nivel de significancia del 95 %. Las evaluaciones se realizaron en Minitab Version 17.

3. Análisis de biodisponibilidad de compuestos bioactivos en sangre y tejidos colectados

Para la evaluación de la biodisponibilidad se llevó a cabo la cuantificación de compuestos fenólicos y sus metabolitos en plasma y tejidos (hígado y cerebro no hipotalámico) siguiendo la metodología de [Fernández-Ochoa et al. \(2020\)](#).

El plasma liofilizado se reconstituyó con agua Mili-Q (10 mg de plasma en 108 µL de agua) y se mezcló hasta homogenizarse. Posteriormente se adicionaron 216 µL de metanol:etanol (50:50 v/v), la muestra se homogenizó para reposarse durante 30 min a -20 °C con el fin de promover la precipitación de proteínas. Las muestras se centrifugaron (14800 rpm, 4°C, 10 min) y se recolectó el sobrenadante. Se tomaron 216 µL del sobrenadante para llevarse a sequedad en un evaporador durante dos horas (Concentrator Plus, Eppendorf, Hamburg, Germany). El resto de los sobrenadantes se recolectaron en un solo vial para formar el Quality control (QC) y se evaporó a sequedad. El pellet resultante se reconstituyó en 100 µL de agua:acetonitrilo (95:5 v/v) y se transfirió a viales para HPLC para su análisis. Diez alícuotas del QC se analizaron con la misma metodología usada para las muestras.

Las muestras de hígado y cerebro fueron liofilizadas para su transportación. Se pesaron 20 mg de tejido con 500 µL de metanol y se procesaron en un sistema de lisis Fast-Prep (FastPrep-24™, MP Biomedicals, CA, USA) por 20 segundos a una velocidad de 4 m/s. Posterior a su homogenización, las muestras fueron sometidas a un baño de ultrasonido por 3 minutos a 4 °C para incubarse por 30 min a -20 °C. Las muestras fueron centrifugadas (14800 rpm, 4 °C, 10 min) y se colectó el sobrenadante; en el pellet formado se sometió a extracción con ultrasonido dos veces más, pero con 250 µL de metanol:agua (80:20 v/v). Los sobrenadantes se colectaron y se juntaron, una alícuota de 700 µL se evaporó a sequedad y el resto del sobrenadante se colectó en un solo tubo para formar

el Quality Control. Una vez evaporados las muestras y los QC se resuspendieron en 200 μ L de metanol:agua 35:65 para hígados y en 400 μ L. Para eliminar impurezas, los extractos de hígado fueron filtrados con acrodiscos de 22 μ m mientras que los extractos de cerebro fueron sometidos a dos centrifugaciones más, separando el sobrenadante.

Las muestras de plasma, hígado y cerebro fueron analizadas en un HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) acoplado a un detector de masas de Ultra-alta definición Q-TOF, equipado con una interfaz de Jet Stream ES1 dual (Agilent 6540), siguiendo la metodología de [Villegas-Aguilar et al., \(2024\)](#) con ligeras modificaciones. La separación de compuestos se llevó a cabo mediante una fase reversa con una columna C18 (Agilent Zorbax Eclipse Plus, 1.8 μ m, 4.6 \times 150 mm) y un gradiente en las fases móviles, donde la fase A es agua acidificada con ácido fórmico (0.1 %) y la fase B es acetonitrilo: 0 min [A:B, 95/5], 5 min [A : B, 90/10], 15 min [A : B, 15/85], 30 min [A : B, 5/95], and 35–40 min [A : B, 95/5]. La columna se mantuvo a 65 °C y el automuestreador a 25 °C. Se inyectaron 5 μ L y el flujo fue de 0.4 mL/min. La detección de masas se obtuvo con el modo ion-negativo con rango de 50 a 1700 m/z. Las muestras se sometieron a diferentes energías de colisión (10, 20 y 40 eV). Se utilizó nitrógeno de alta calidad para secar y nebulizar la muestra (200 °C, 10 L/min; 350 °C, 12 L/min). La calibración se llevó a cabo con anión de trifluoracetato (m/z= 112.985587) y un aducto de HP-921 (m/z 1033.988109).

La secuencia utilizada fue diseñada conforme a las guías y consideraciones para metabolómica no dirigida, acorde a [Klãvus et al., \(2020\)](#). Para ello, se comenzó con la inyección de los blancos, después cinco inyecciones de QC's para estabilizar el equipo. Se inyectaron ocho muestras experimentales (una de cada subgrupo seleccionadas al azar) y posteriormente un QC, formando estos bloques hasta terminar con el número de muestras. Una vez terminada la secuencia se cerró la lista de inyección con dos QC's y dos blancos.

Los archivos obtenidos de transformaron de su extensión .d a extension .mzML utilizando el software MsConvert con el fin de poder procesarlos en MZmine versión 4.3 ([Schmid et al., 2023](#)). Los parámetros establecidos para el procesamiento de datos de

cada tejido y el plasma se muestran en el Cuadro 5. Estos parámetros fueron seleccionados después de analizar manualmente los resultados de los QCs y los blancos para posteriormente aplicarse a todas las muestras.

Una vez obtenidas las listas de picos cromatográficos alineadas se procedió a realizar un análisis de filtrado para eliminar señales de posibles contaminantes o sin importancia biológica; para ello se utilizó el paquete de RStudio (Versión 2024.12.1, Build 563) llamado “Notame” (Klãvus et al., 2020). Este paquete de uso libre incluye parámetros como detección de contaminantes, así como eliminación de señales no persistentes en los QCs. Los resultados para plasma, hígado y cerebro fueron divididos en su subgrupo correspondiente de acuerdo con la dieta administrada y la hora del día de eutanasia. Cualquier señal que no apareciera en el 80 % de las réplicas biológicas se determinó como contaminante o sin relevancia biológica.

Los metabolitos fenólicos se identificaron por características moleculares con bases de datos metabolómicos online, utilizando pruebas estadísticas como comparación de masa molecular, el parámetro m/z , distribución isotópica y patrones de fragmentación. Para esto, se utilizó la página CEU Mass Mediator (<https://ceumass.eps.uspceu.es/>). Se consideraron como compuestos a identificar solamente aquellos con diferencias estadísticas significativas entre grupos y con un patrón de fragmentación.

Cuadro 5. Parámetros utilizados en MZmine para construcción de cromatogramas y procesamiento de datos.

Parámetro	Plasma	Hígado	Cerebro
<i>Detección de masa</i>			
Ruido en MS1	1x10 ³	1x10 ³	2 x10 ³
Ruido en MS2	1x10 ²	1x10 ¹	4 x10 ¹
<i>Constructor de cromatogramas</i>			
Mínimo de escaneos seguidos	6	5	6
Intensidad mínima	1x10 ³	1x10 ³	2 x10 ³
Altura mínima	1x10 ⁴	1x10 ⁴	2 x10 ⁴
Tolerancia	0.0100 / 25 ppm	0.015 / 25ppm	0.01 / 25 ppm
<i>Deconvolución</i>			
Límite	85%	85%	85%
Movilidad de tiempo de retención	0.05	0.05	0.05
<i>Alineación</i>			
Tolerancia de m/z	0.005 / 25 ppm	0.002 / 5 ppm	0.002 / 25 ppm
Tolerancia de tiempo de retención (min)	0.18	0.14	0.7
<i>Filtrado</i>			
Máximo de repeticiones	6	6	6
<i>Relleno de huecos</i>			
Tolerancia	0.1	0.2	0.2
Error permitido	0.005 / 25 ppm	0.005 / 25 pmm	0.005 / 25 ppm
Numero de escaneos mínimo	6	5	6
<i>Filtrado de duplicados*</i>			
Tolerancia de tiempo de retención (min)	0.1	0.14	N/A
Tolerancia de m/z	0.005 / 25 ppm	0.005 / 25 ppm	N/A

N/A: No aplica. *En caso de cerebro no se aplicó el filtrado de duplicado debido a tratamientos extra de alineación.

a) Análisis estadístico

El análisis estadístico de la biodisponibilidad de compuestos fenólicos se realizó en el software libre MetaboAnalyst 6.0 utilizando los datos previamente trabajados en MZmine y Rstudio. Los datos fueron normalizados antes de llevar a cabo los análisis multivariantes utilizando una transformación logarítmica base 10 y una auto-escala (La media dividida entre la desviación de cada variable). Se realizó un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés), primero se llevó a cabo con los QCs con el fin de evaluar la calidad de los datos, posteriormente se excluyeron los QCs para ver solamente el efecto de los tratamientos y hora de eutanasia. Los patrones de comportamiento de los metabolitos fueron analizados con un Heatmap, utilizándose como una forma para previsualizar los efectos de la dieta y la hora de eutanasia. Finalmente, se realizó un ANOVA de una vía ($p < 0.05$) con una prueba pos-hoc de Fisher, con el fin de determinar las diferencias significativas en los metabolitos encontrados. Si bien se obtuvieron alrededor de 1000 compuestos con diferencias significativas, para fines de este documento solamente estaremos presentando los resultados de aquellos que dependan del efecto de la suplementación con cacao (STD vs STD+Ing o HFD vs HFD+Ing) sin considerar la hora de eutanasia; los resultados significativos de estas comparaciones que cumplan con las condiciones de fragmentación serán utilizados para identificarse de las formas mencionadas en la sección anterior.

IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a. Etapa 1: Diseño y caracterización del ingrediente de cacao

1. Caracterización de las materias primas

a) Composición proximal de las materias primas

La composición proximal de los subproductos de cacao, vaina fermentada y cascarilla se presenta en el Cuadro 6. El contenido de lípidos resultó menor en vaina ($p < 0.05$) que en cascarilla (0.22 contra 15.09 g/100 g, respectivamente). El perfil lipídico de la cascarilla de cacao ya ha sido reportado y se han encontrado principalmente ácidos grasos monoinsaturados, destacando el ácido oleico (El-Saied et al., 1981). Debido a los beneficios a la salud atribuidos a los ácidos grasos monoinsaturados y al perfil presentado, algunos autores proponen que el valor nutricional de grasa proveniente de cascarilla de cacao es mejor que respecto a la de cocoa (Okiyama et al., 2017). La combinación de vaina y cascarilla para la formulación del ingrediente funcional podría aportar una baja cantidad de grasa, debido al poco porcentaje de la vaina, pero con un buen perfil lipídico debido al aporte por la cascarilla.

El contenido de proteína para ambas muestras se encuentra dentro de lo reportado por la literatura, siendo 4.9 a 9.8 % para vaina (Mendoza-Zamorano, 2022) y de 6 a 20 % para cascarilla (Rojo-Poveda et al., 2020). Tanto vaina como cascarilla presentan un perfil variado de aminoácidos, destacando el contenido de aminoácidos esenciales, con valores de 39 % para cascarilla y 45 % para vaina (Campos-Vega et al., 2018). Por lo anterior, el desarrollo de un ingrediente funcional a partir de estos dos subproductos de la cadena del cacao podría resultar en una fuente de proteína vegetal de alta calidad.

Debido a su función botánica y al resto de la composición química, la vaina presenta un mayor contenido de carbohidratos que la cascarilla ($p < 0.05$). Es importante resaltar que gran parte de estos carbohidratos, en ambos subproductos, se presenta en forma de fibra dietaria. El contenido de fibra dietaria total (Cuadro 6) resultó significativamente

mayor ($p < 0.05$) para la vaina (65 g/100 g) respecto a la cascarilla (50 g/100 g). Los valores de ambos subproductos se encuentran dentro de lo reportado por la literatura, con 60 a 65 % para vaina (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020) y de 50 a 60 % para cascarilla (Okiyama *et al.*, 2017). Se ha reportado que el contenido de fibra insoluble de la vaina de cacao fermentada durante 24 h con *Rhizopus oligosporus* es de 51 g/100 g (Mendoza-Zamorano, 2022), mientras que la cascarilla seca contiene de 28 a 51 g/100 g (Rojo-Poveda *et al.*, 2020).

Cuadro 6. Composición proximal de los subproductos de cacao

Componente (g/100 g)	Vaina	Cascarilla
Humedad	2.88 ± 0.08	3.88 ± 0.05*
Lípidos	0.22 ± 0.00	15.09 ± 0.15*
Proteínas	6.52 ± 0.39	15.84 ± 0.11*
Cenizas	7.24 ± 0.10	5.92 ± 1.15
Carbohidratos	83.15 ± 0.24*	59.97 ± 0.67
de los cuales:		
Fibra total	65.47 ± 1.09*	50.21 ± 0.91
Insoluble	50.06 ± 3.11*	38.25 ± 1.42
Soluble	15.40 ± 2.33	11.95 ± 1.19
Pectina	7.64 ± 0.02	6.00 ± 0.63

Los valores se presentan como media ± error estándar de al menos tres repeticiones. Los asteriscos indican diferencias significativas entre columnas por prueba de t^* para dos muestras independientes ($p < 0.05$).

En el caso de la fibra soluble, ambos productos presentaron valores similares, obteniendo 15.40 y 11.95 g/100 g para vaina y cascarilla respectivamente (**Cuadro 6**). La vaina de cacao ha sido poco estudiada después del tratamiento llevado a cabo en el presente trabajo, reportes de vaina extruida (no fermentada) indican que la fibra soluble tiene valores 7.3 g/100 g (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020). La fermentación con *Rhizopus* ha demostrado ejercer cambios en el perfil de la fibra al degradar cadenas de fibra insoluble, debido a su metabolismo lignocelulósico, y generar cadenas más pequeñas, que si pueden ser clasificadas como fibra soluble (Vong *et al.*, 2018). Por lo que el procesamiento a la vaina de cacao contribuye a un mayor aporte de fibra soluble para el

ingrediente a diseñar. Un mayor aporte de fibra soluble se podría relacionar con la modulación del reloj biológico, debido a los AGCC producidos durante fermentación colónica.

En vaina, los valores de pectina van desde los 2 hasta los 10 g/100 g ([Campos-Vega et al., 2018](#)), coincidiendo con lo obtenido en este trabajo para vaina extruida y fermentada, donde se encontraron 7.64 g/100 g. La fibra de cascarilla de cacao se compone de 45 % de pectina ([Rojo-Poveda et al., 2020](#)), similar a lo obtenido en el presente estudio, donde el contenido de pectina alcanzó los 6 g/100 g. El alto contenido de pectina en vaina y cascarilla sugieren que la combinación de ambas sea aprovechada para obtener propiedades tecno-funcionales deseadas en la industria alimentaria, así como los beneficios a la salud atribuidos.

b) Composición bioactiva de las materias primas

El Cuadro 7 muestra la composición bioactiva de los subproductos, la cascarilla de cacao presentó menor contenido de compuestos fenólicos totales respecto a la vaina fermentada ($p < 0.05$), alcanzando los 20 mg EAG/g de muestra. El contenido de fenoles totales para cascarilla se ha reportado de 9.40 a 49.46 mg de ácido gálico/g PS ([Hernández-Hernández et al., 2018](#)); la variabilidad en los valores de estos compuestos se debe a las condiciones de extracción, el tamaño de partícula de la harina, las condiciones ambientales del cultivo, genotipo y variedad del cacao, pero principalmente a las condiciones de fermentación de los granos de cacao para la producción del chocolate ([Botella-Martínez et al., 2021](#)). El contenido de flavonoides totales (**Cuadro 7**) para ambos subproductos resultó diferente estadísticamente ($p < 0.05$), siendo mayor el contenido en vaina (342 μg ER/g) que en cascarilla (208 μg ER/g). Específicamente en el caso de la vaina de cacao, los hongos filamentosos como *Rhizopus* pueden degradar el contenido de flavonoides como parte de su metabolismo.

Cuadro 7. Composición nutracéutica de los subproductos de cacao

Componente	Vaina	Cascarilla
Fenoles totales ¹	24.99 ± 0.30*	20.05 ± 0.30
Flavonoides totales ²	342.52 ± 14.96*	208.21 ± 4.65
Taninos condensados ³	9.68 ± 0.04*	9.07 ± 0.15
Melanoidinas ⁴	9.51 ± 0.20	34.52 ± 0.98 *

Los valores se presentan como media ± error estándar de dos muestras independientes con al menos tres repeticiones. ¹mg equivalentes de ácido gálico/g peso seco (PS). ²µg equivalentes de rutina/g PS. ³mg equivalentes de catequina/g PS. ⁴mg de melanoidinas de caramelo/g PS. Asteriscos indican diferencias significativas entre columnas por prueba de t* para dos muestras independientes (p<0.05).

El contenido de taninos condensados fue mayor en vaina que en cascarilla (p<0.05) con valores de 9.68 y 9.07 mg EC/g, respectivamente. En un estudio donde se evaluó el efecto de la extrusión sobre la vaina de cacao se encontró que los taninos alcanzan 15.8 mg equivalentes de rutina/g, pero después de la fermentación con *Rhizopus*, puede disminuir a 5 mg/g, debido al metabolismo del hongo ([Mendoza-Zamorano, 2022](#); [Nieto-Figueroa et al., 2020](#)). Las melanoidinas son el producto final de la reacción de Maillard, donde un carbohidrato reacciona con un grupo amino para dar compuestos coloridos con características sensoriales específicas, cuyos beneficios a la salud van desde capacidad antioxidante hasta función prebiótica ([Shaheen et al., 2021](#)). El contenido de melanoidinas de ambos subproductos de cacao se presenta en el Cuadro 7 y resultó casi cuatro veces mayor para cascarilla que para vaina (p<0.05), teniendo valores de 34.51 y 9.52 mg de melanoidinas de caramelo/g de muestra, respectivamente. La presencia de melanoidinas en ambos subproductos sugiere que tengan características sensoriales similares al chocolate, lo que deriva en una alternativa para saborizar productos alimenticios sin necesidad de utilizar chocolate, resultando una opción ecológica y de menor precio que la original.

En el Cuadro 8 se presenta el perfil fenólico de vaina y cascarilla de cacao, realizado por medio de HPLC-DAD. La vaina presentó un perfil de compuestos más variado que la

cascarilla, sin embargo, la concentración de los compuestos presentes en cascarilla es mayor que en vaina ($p < 0.05$), con un contenido total de 1860 y 33176 mg, para vaina y cascarilla respectivamente. Por su parte, debido a que las condiciones de fermentación de los granos de cacao varían de proceso en proceso, el perfil fenólico de la cascarilla es más variado alcanzando valores de epicatequina desde 210 hasta 34,000 $\mu\text{g/g}$ y de 180 a 4500 $\mu\text{g/g}$ de catequina (Hernández-Hernández *et al.*, 2019).

Cuadro 8. Perfil fenólico por HPLC-DAD de los subproductos de cacao

Compuesto ($\mu\text{g/g}$)	Vaina	Cascarilla
Ácido elágico	37.7 ± 1.6	ND
Catequina	560.8 ± 37.4	$2735 \pm 87.6^*$
Epicatequina	816.1 ± 91.6	$9453 \pm 671.5^*$
Ácido gálico	147.7 ± 6.6	$20988 \pm 45.3^*$
Ácido clorogénico	ND	BLC
Ácido caféico	260.6 ± 8.1	BLC
Ácido cumárico	37.9 ± 0.5	ND
Ácido ferúlico	ND	BLC
Total	1860.7 ± 99.8	$33176 \pm 678.7^*$

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de dos muestras independientes con dos repeticiones. Asteriscos indican diferencias significativas entre columnas por prueba de t para dos muestras independientes ($p < 0.05$). ND=No detectado. BLC: Bajo límite de cuantificación

El contenido de ácidos fenólicos resulta menor que los flavonoides, a excepción del ácido gálico, el cual se encuentra en altas concentraciones en la cascarilla. Tanto para cascarilla como para vaina, la presencia de ácidos fenólicos parece no ser tan relevante, reportándose en la literatura menos de 75 $\mu\text{g/g}$ para vaina (Dewi *et al.*, 2022) y 126 $\mu\text{g/g}$ para cascarilla (Rojo-Poveda *et al.*, 2021). Las condiciones de extracción como el solvente utilizado, el método para extraerlos, el tamaño de partícula de la harina, la variedad estudiada, la zona de cultivo, entre otros factores pueden generar que se libere una menor o mayor cantidad de compuestos, así como un perfil de compuestos distinto (Dewi *et al.*, 2022), pudiendo explicar los resultados obtenidos en este trabajo.

c) Capacidad antioxidante de las materias primas

La capacidad antioxidante medida por el método de inhibición del radical DPPH (**Figura 5**) resultó mayor en cascarilla comparada con la vaina. En general, ambos subproductos presentaron una mayor efectividad contra el radical DPPH al compararlo con lo reportado por la literatura donde Delgado-Ospina et al., 2021b reportaron 33 y 18 mg equivalentes de trolox (ET)/g PS para vaina y cascarilla, respectivamente, estas diferencias pueden deberse al proceso de fermentación con *Rhizopus* en el caso de la vaina y la fermentación tradicional para la cascarilla (Delgado-Ospina et al., 2021b). Al realizar una correlación de Pearson de la actividad antioxidante por DPPH con la composición de los subproductos se encontró que esta tiene una correlación positiva con la concentración de ácido cumárico en vaina ($r= 0.999$, $p= 0.0035$) y una relación negativa con los ácidos elágico y caféico, así como con la catequina, epicatequina y el contenido total de fenoles ($p<0.05$); estas correlaciones nos indican que los ácidos fenólicos son responsables en parte de la capacidad antioxidante medida por DPPH en vaina y cascarilla, lo que coincide con lo reportado por Dominguez-Hernandez et al. (2023), donde indica que la cinética de acción de DPPH tiene afinidad a los ácidos fenólicos.

La capacidad de inhibir el radical sintético ABTS fue mayor para la vaina de cacao que para la cascarilla, con valores de 35 y 27 mg ET/g, respectivamente (**Figura 5**). En vaina. el contenido de taninos presenta una correlación negativa ($p<0.05$) con la capacidad antioxidante medida por ABTS, lo que sugiere que, a mayor contenido de estos, menor actividad se verá expresada. La capacidad de reducir el ion hierro (**Figura 5**), medida por FRAP, resultó mayor ($p<0.05$) para vaina que para cascarilla. El contenido de flavonoides en vaina, así como el de taninos en cascarilla mostraron una correlación fuerte ($r= 0.8696$) y débil ($r= 0.3542$), respectivamente, con la actividad antioxidante medida por FRAP ($p<0.05$).

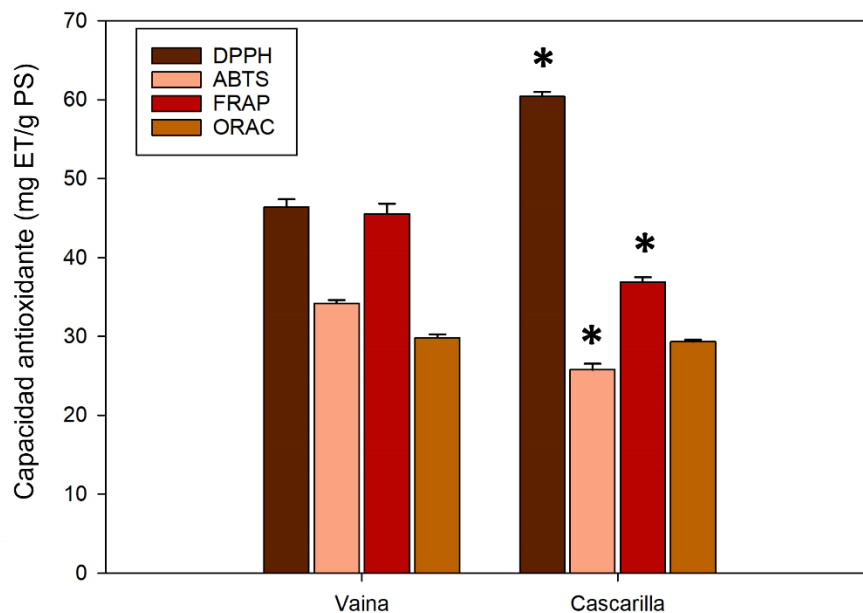


Figura 5. Capacidad antioxidante de los subproductos de cacao, medida por diferentes métodos.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de al menos seis repeticiones. *indican diferencias significativas entre muestras por cada prueba de capacidad antioxidante, utilizando la prueba de t para dos muestras independientes ($p < 0.05$).

Los valores para la capacidad antirradical peroxilo por el método de ORAC tanto para vaina como cascarilla se presentan en la **Figura 5**. Esta medición no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) entre muestras, alcanzando los 30 mg ET/g de muestra. Debido a que la exploración a nuevas fuentes alimentarias utilizando los subproductos del cacao es de reciente interés, este es el primer trabajo donde se evalúa la capacidad antioxidante en un mecanismo con condiciones parecidas a las fisiológicas (pH, temperatura y radical) como lo es la prueba de ORAC (Dávalos et al., 2004). Los compuestos fenólicos identificados por HPLC en la cascarilla tuvieron una correlación negativa con la capacidad antioxidante por ORAC ($r = -0.997$, $p = 0.050$), lo que indica que estos compuestos no son los que están proporcionando esta propiedad.

d) *Propiedades tecno-funcionales de las materias primas*

La evaluación de propiedades tecnofuncionales en los subproductos de cacao se llevó a cabo con el fin de sugerir algún uso industrial. Los resultados para ambos subproductos se presentan en el Cuadro 9. La capacidad de retención de agua (CRA) de la vaina alcanzó los 21.89 mL de agua/g, mientras que la cascarilla los 26.59 mL de agua/g, por lo que fue mayor en cascarilla contra la vaina ($p < 0.05$); mientras que la capacidad de retención de aceite (CRAc) y de hinchamiento (CH) presentaron el patrón opuesto, con CRAc de 8.14 y 7.82 mL de aceite/g para vaina y cascarilla, respectivamente. La CRA y CRAc de un ingrediente está determinada por factores como los aminoácidos que conforman a sus proteínas, la hidrofobicidad de sus cadenas, la concentración de proteína, el pH y temperatura del medio, entre otros (Villaseñor *et al.*, 2021).

Cuadro 9. Propiedades tecno-funcionales de los subproductos de cacao

Propiedad	Vaina	Cascarilla
C. Retención de agua ¹	21.89 ± 0.85	26.59 ± 0.32*
C. Retención de aceite ²	8.14 ± 0.04*	7.82 ± 0.08
C. Hinchamiento ³	12.61 ± 0.75*	3.61 ± 0.31
C. Formar espuma ⁴	0.62 ± 0.03	1.20 ± 0.11*
C. Retener espuma ⁵	0.36 ± 0.04	1.68 ± 0.17*
C. Formar emulsiones ⁶	74.88 ± 7.31*	48.92 ± 1.53
C. Retener emulsiones ⁷	43.24 ± 2.01*	0.00 ± 0.00

Los resultados se expresan como media ± error estándar de tres repeticiones. Asteriscos indican diferencias significativas entre columnas por prueba de t para dos muestras independientes ($p < 0.05$). C = Capacidad. ¹expresada como g de agua absorbidos/g de muestra. ²expresada como g de aceite absorbidos/g de muestra. ³cambio de volumen en mL/g de muestra. ⁴mL de espuma formados/g de muestra. ⁵mL de espuma después de 5 min/g de muestra. ⁶mL de emulsión formada/g de muestra. ⁷mL de emulsión después de 30 min de calentamiento/g de muestra.

Se realizaron correlaciones de las propiedades tecnofuncionales y la composición de los subproductos. Para la vaina, la CRA y CRAc dependen del contenido de proteína, teniendo una correlación positiva ($r = 0.9423$, $p = 0.0049$; $r = 0.09811$, $p = 0.0005$) sugiriendo que, a mayor cantidad de estas, mejor será la capacidad para absorber, tanto agua como aceite. La CH de la vaina presenta un comportamiento directamente

proporcional al contenido de pectina ($p=0.0000$, $r=0.9947$) e inversamente proporcional al contenido de fibra total y soluble presente en la vaina. Por su parte, la CRA de la cascarilla tiene una correlación positiva ($p=0.0060$, $r=0.9360$) con el contenido de proteína; mientras que la CH es inversamente proporcional al contenido de proteína ($p=0.0017$, $r=-0.9960$) sugiriendo que el contenido de proteína (15 g/100 g) presente en cascarilla podría ser el responsable de su baja capacidad de hinchamiento.

La capacidad de formar y estabilizar emulsiones nos indica la máxima cantidad de lípidos que pueden emulsionarse, esta depende de la hidrofobicidad y la estructura secundaria de las proteínas (Villaseñor *et al.*, 2021). La vaina presentó mayor capacidad para formar emulsiones que la cascarilla ($p<0.05$), con valores de 74.88 y 48.92 mL de emulsión/g de muestra, respectivamente. Mientras que la cascarilla no tuvo la capacidad para retener las emulsiones formadas después de la exposición al calor, la vaina preservó 43 mL de emulsión/g de muestra (**Cuadro 9**). La presencia de proteínas en vaina es responsable de la capacidad de la vaina para formar espumas ($r=0.9664$, $p=0.0017$) mientras que en cascarilla esta propiedad depende de la cantidad de fibra total y soluble ($r=0.8812$, $p=0.0203$; $r=0.8774$, $p=0.0216$).

2. Caracterización de las mezclas diseñadas a partir de vaina y cascarilla de cacao

a) Composición proximal de las mezclas diseñadas

El diseño de mezclas elegido fue de dos factores en dos niveles, por lo que las mezclas se llevaron a cabo de la siguiente manera: la Mezcla 1 (M1) consiste en partes iguales de cascarilla y vaina; la Mezcla 2 (M2) cuenta con dos partes de cascarilla por una de vaina; por último, la Mezcla 3 (M3) consiste en dos partes de vaina por una de cascarilla. La caracterización química de las mezclas diseñadas se presenta en el Cuadro 10.

El contenido de lípidos fue mayor en la M2 (9.63 g/100 g) y el contenido más bajo se encontró en la M3 (5.30 g/100 g). Estos resultados eran esperados debido a que la M2

tiene un mayor contenido de cascarilla, que es rica en lípidos; mientras que la M3 al tener más cantidad de vaina la concentración de lípidos se reduce. De acuerdo con las clasificaciones establecidas por el Reglamento del Parlamento Europeo No 1924/2006 (Consejo, 2006), el contenido de proteína obtenido en la M1 se puede considerar como alto contenido de proteína (10 g/100 g) ya que el porcentaje de calorías provenientes de estas supera el 20 % de las calorías totales; mientras que las M2 (9.92 g/100 g) y M3 (8.16 g/100 g) entran en la clasificación de fuentes de proteínas. Desarrollar un ingrediente de origen vegetal con un alto contenido de proteínas, o bien fuente de proteína, es un área de creciente demanda para la industria alimentaria específicamente de la industria de la panadería y pastelería, que están en constante búsqueda de fuentes de proteína sostenibles para el desarrollo de nuevos productos más amigables con el medio ambiente (Polachini *et al.*, 2022).

Cuadro 10. Composición proximal de las mezclas diseñadas con vaina y cascarilla de cacao

Componente (g/100 g)	Mezcla 1 (C:V 1:1)	Mezcla 2 (C:V 2:1)	Mezcla 3 (C:V 1:2)
Humedad	4.85 ± 0.03 ^a	5.14 ± 0.06 ^a	5.24 ± 0.19 ^a
Lípidos	7.79 ± 0.10 ^b	9.63 ± 0.98 ^a	5.30 ± 0.24 ^c
Proteínas	10.02 ± 0.02 ^a	9.92 ± 0.03 ^a	8.16 ± 0.18 ^b
Cenizas	7.47 ± 0.09 ^{ab}	7.20 ± 0.10 ^b	7.74 ± 0.03 ^a
Carbohidratos	69.87 ± 0.13 ^b	68.11 ± 0.39 ^c	73.56 ± 0.27 ^a
de los cuales:			
Fibra total	47.60 ± 1.73 ^a	46.98 ± 2.31 ^a	51.11 ± 0.95 ^a
Insoluble	41.32 ± 1.68 ^a	41.81 ± 2.22 ^a	45.48 ± 0.80 ^a
Soluble	6.28 ± 0.32 ^a	5.17 ± 0.11 ^a	5.64 ± 0.57 ^a
Pectina	8.50 ± 0.43 ^a	4.40 ± 0.13 ^b	8.81 ± 0.24 ^a

Los valores se presentan como media ± error estándar de al menos tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas utilizando prueba de Tukey-Kramer para diferencia de medias ($p < 0.05$).

El contenido de fibra teórico establecido por el diseño de mezclas (**Cuadro 2**) se alcanzó solamente en la M3, con un valor teórico de 51.66 g/100 g y valores reales de 50.16 a 52.06 g/100 g; el resto de las mezclas se mantuvieron alrededor de medio gramo

por debajo de lo esperado teóricamente. Las tres mezclas pueden ser clasificadas como alimentos alto en fibra de acuerdo con la normativa del Reglamento del Parlamento Europeo No 1924/2006 para las declaraciones nutricionales (Consejo, 2006), ya que presentan más de 6 gramos de fibra por cada 100 g de producto. Diseñar un alimento rico en fibra, con propiedades sensoriales similares al chocolate, debido a la presencia de cascarilla (de Barros *et al.*, 2020), puede resultar en una manera aceptable y sencilla de implementar fibra en productos que generalmente carecen de estas moléculas, como podrían ser los productos de panificación. La igualdad respecto a la cantidad de fibra entre las tres mezclas sugiere que el ingrediente para continuar el experimento podría ser seleccionado por cualquier otra variable, ya que el contenido de fibra sería constante para esto, sugiriendo optar por el contenido de compuestos bioactivos, específicamente de catequina o epicatequina.

El contenido de pectina en las mezclas dependió de la adición de vaina de cacao. Al tratarse de un ingrediente novedoso, la cantidad de pectina puede compararse con otras matrices conocidas por un alto contenido de esta; por ejemplo, las mezclas M1 y M3 presentan un mayor contenido que las vainas de chícharo mientras que M2 puede equipararse a la pulpa de manzana (Müller-Maatsch *et al.*, 2016). Adicionar más de 10 g de fibra soluble al día, como la pectina, a la dieta se ha relacionado con diferentes beneficios, siendo uno de los más relevantes la producción de AGCC, incluyendo acetato, propionato, butirato, ácidos carboxílicos y ácido láctico, los cuales activan distintos receptores a lo largo del epitelio intestinal que pueden activar la diferenciación de lípidos, así como sincronizar los relojes periféricos (Ioniță-Mîndrican *et al.*, 2022; Tahara *et al.*, 2018).

b) Composición bioactiva de las mezclas diseñadas

La composición nutraceútica de las mezclas se presenta en el Cuadro 11. Las mezclas M2 y M3 presentaron un contenido de fenoles totales mayor que las materias primas por separado, sugiriendo un comportamiento sinérgico de los compuestos al momento de ser cuantificados. Comparando el contenido de flavonoides con lo esperado teóricamente

(**Cuadro 2**) se observa un contenido de 20 a 40 veces menor de lo establecido en el diseño de mezclas, el cual se realizó con valores de la literatura (Delgado-Ospina et al., 2021b), el procesamiento previo, las condiciones de cosecha y el estado de madurez para cada trabajo podrían explicar estas diferencias pues se trata de metabolitos secundarios. El contenido de flavonoides totales y taninos condensados no resultó diferente ($p>0.05$) entre mezclas, además, los valores de estos dos parámetros se encuentran dentro de lo esperado de acuerdo a su concentración en las materias primas. La concentración de melanoidinas en los ingredientes diseñados con mezclas de vaina y cascarilla presentó un comportamiento esperado, donde las dos mezclas con mayor proporción de cascarilla tienen un mayor contenido de melanoidinas ($p<0.05$).

Cuadro 11. Composición nutracéutica de las mezclas diseñadas con vaina y cascarilla de cacao

Componente	Mezcla 1 (C:V 1:1)	Mezcla 2 (C:V 2:1)	Mezcla 3 (C:V 1:2)
Fenoles totales ¹	23.58 ± 0.39 ^b	26.12 ± 0.41 ^{ab}	28.73 ± 0.91 ^a
Flavonoides totales ²	299.52 ± 9.55 ^a	354.44 ± 13.83 ^a	374.99 ± 25.00 ^a
Taninos condensados ³	9.34 ± 0.12 ^a	9.54 ± 0.11 ^a	9.51 ± 0.15 ^a
Melanoidinas ⁴	21.37 ± 0.55 ^a	21.21 ± 0.23 ^a	18.45 ± 0.43 ^b

Los valores se presentan como media ± error estándar de dos muestras independientes con al menos tres repeticiones. ¹mg equivalentes de ácido gálico/g peso seco (PS). ²μg equivalentes de rutina/g PS. ³mg equivalentes de catequina/g PS. ⁴mg de melanoidinas de caramelo/g PS. Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas utilizando prueba de Tukey-Kramer para diferencia de medias ($p<0.05$).

Es posible apreciar que el perfil fenólico de las mezclas formuladas (**Cuadro 12**) se vio beneficiado por el efecto de mezclar los compuestos provenientes de vaina y cascarilla: la vaina presentó un perfil fenólico rico en ácidos fenólicos (**Cuadro 8**) mientras que la cascarilla en catequina, epicatequina y ácido gálico, la combinación de estos dos subproductos generó un perfil fenólico variado con ambos grupos de polifenoles.

Cuadro 12. Perfil de compuestos fenólicos por HPLC-DAD de las mezclas realizadas con vaina y cascarilla de cacao.

Compuesto (µg/g)	Mezcla 1 (C:V 1:1)	Mezcla 2 (C:V 2:1)	Mezcla 3 (C:V 1:2)
Ácido elágico	43.58 ± 4.41 ^a	38.45 ± 3.60 ^a	41.23 ± 0.38 ^a
Catequina	1600.38 ± 57.09 ^{ab}	1873.25 ± 71.86 ^a	1321.87 ± 87.21 ^b
Epicatequina	6791.30 ± 100.21 ^{ab}	7825.83 ± 644.23 ^a	4573.55 ± 538.03 ^b
Ácido gálico	14166.18 ± 512.64 ^b	18404.18 ± 146.33 ^a	12403.93 ± 27.53 ^b
Ácido caféico	340.00 ± 2.27 ^{ab}	288.16 ± 24.50 ^b	384.97 ± 12.30 ^a
Ácido cumárico	43.86 ± 0.33 ^b	39.28 ± 0.75 ^c	47.13 ± 0.43 ^a
Total	22985 ± 525 ^b	28469 ± 665 ^a	18772 ± 546 ^c

Los resultados se expresan como media ± error estándar de dos muestras independientes con dos repeticiones. Letras diferentes indican diferencia significativa entre columnas utilizando prueba de Tukey-Kramer para diferencia de medias ($p < 0.05$).

Diversos estudios han evaluado a los compuestos tipo flavonoide y ácidos fenólicos respecto su papel sobre el ciclo circadiano. En las tres mezclas realizadas los principales compuestos predominantes son la catequina, epicatequina y el ácido gálico. Los compuestos presentes en el perfil fenólico de los ingredientes diseñados han sido anteriormente probados respecto a su capacidad para modular el reloj biológico a nivel proteico y genético. Por ejemplo, los ácidos fenólicos modifican la amplitud de *Bmal1* (Guo et al., 2018; Oishi et al., 2017), siendo más efectivo el efecto en compuestos del tipo ácidos hidroxicinámicos, como cumárico y cafeico, dos ácidos presentes en los ingredientes de cacao. Las proantocianidinas han sido evaluadas respecto a su capacidad de modular el reloj biológico, encontrando que regulan la expresión de *Bmal1* y *Nampt* tanto en el hipotálamo como en relojes periféricos (Aragonès et al., 2016; Casanova et al., 2014; Ribas-Latre et al., 2015a; Ribas-Latre et al., 2015b). Estos compuestos pueden descomponerse en catequinas, epicatequina y ácido gálico, los cuales se encuentran presentes en las mezclas de vaina y cascarilla, sugiriendo que los ingredientes diseñados puedan ejercer un efecto sobre la regulación de relojes periféricos.

c) Capacidad antioxidante de las mezclas diseñadas

La capacidad antioxidante de las mezclas diseñadas se presenta en la **Figura 6**. Es posible apreciar que ninguna de las mezclas tuvo una mejor capacidad antioxidante que otra en ninguno de los métodos analizados ($p>0.05$). Estos resultados sugieren que los compuestos presentes en las mezclas diseñadas pueden actuar de manera conjunta, generando que la capacidad para reaccionar por cada mecanismo se vea favorecida.

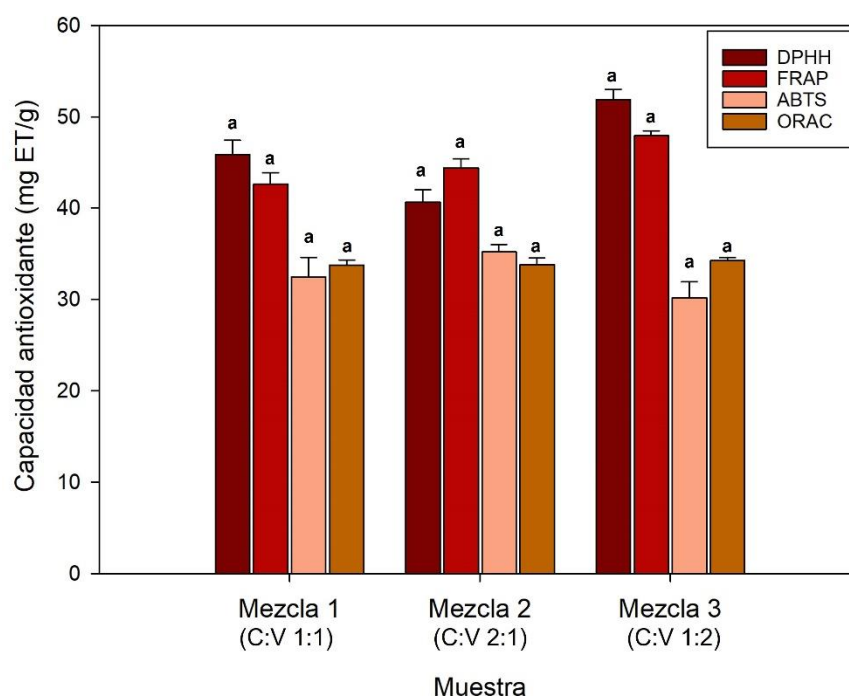


Figura 6. Capacidad antioxidante, medida por diferentes métodos, para las mezclas realizadas con vaina y cascarilla de cacao.

Los valores se presentan como media \pm error estándar de al menos seis repeticiones. Letras diferentes indican diferencia significativa utilizando prueba de Tukey-Kramer para diferencia de medias por muestra para cada prueba de capacidad antioxidante ($p<0.05$).

El perfil nutracéutico de los ingredientes diseñados es el responsable de la capacidad antioxidante presentada. Para la muestra M2 se presentó una correlación negativa de parte de los compuestos fenólicos totales con la capacidad medida por ORAC ($r=-0.210$, $p=0.035$). En la M3, la capacidad antioxidante medida por ABTS depende fuertemente de

los compuestos fenólicos totales ($r=0.843$, $p=0.0035$), sugiriendo que, a mayor concentración de estos, incrementará la capacidad por ABTS. Respecto a los compuestos fenólicos por separado, en M1, el ácido cumárico presentó una fuerte correlación ($r=1.0000$, $p=0.008$) con la capacidad antioxidante por FRAP, mientras que en M2, el ácido cafeico tiene una correlación con la capacidad medida por DPPH ($r=0.998$, $p<0.05$). Esto nos sugiere que los ácidos fenólicos pueden ser los responsables de la capacidad antioxidante.

d) Propiedades tecno-funcionales de las mezclas diseñadas

Al igual que a las materias primas, las mezclas diseñadas fueron caracterizadas respecto a sus propiedades tecnofuncionales, las cuales se presentan en el Cuadro 13. La CRA resultó similar ($p>0.05$) para las tres mezclas, además que esta se mantuvo dentro de lo esperado de acuerdo con la CRA de las materias primas con valores de 24 a 26 mL de agua/g. La capacidad para formar y retener espumas (**Cuadro 13**) presentó un comportamiento dependiente de la proporción de cascarilla de cacao adicionada, resultando mayor en la muestra M2, seguida de M1 y al final M3 ($p<0.05$).

Cuadro 13. Propiedades tecno-funcionales de las mezclas realizadas con vaina y cascarilla de cacao.

Propiedad	Mezcla 1 (C:V 1:1)	Mezcla 2 (C:V 2:1)	Mezcla 3 (C:V 1:2)
C. Retención de agua ¹	24.75 ± 1.12 ^a	26.45 ± 0.31 ^a	25.74 ± 0.04 ^a
C. Retención de aceite ²	13.97 ± 0.33 ^a	14.40 ± 0.52 ^a	14.11 ± 0.81 ^a
C. Hinchamiento ³	8.14 ± 0.65 ^a	6.57 ± 0.73 ^b	8.41 ± 0.04 ^a
C. Formar espuma ⁴	3.28 ± 0.07 ^b	4.85 ± 0.10 ^a	2.82 ± 0.01 ^c
C. Retener espuma ⁵	2.02 ± 0.07 ^b	3.12 ± 0.10 ^a	1.06 ± 0.07 ^c
C. Formar emulsiones ⁶	78.84 ± 4.69 ^a	58.38 ± 0.53 ^b	84.66 ± 3.29 ^a
C. Retener emulsiones ⁷	17.41 ± 1.49 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b

Los resultados se expresan como media ± error estándar de tres repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre columnas usando la prueba de Tukey-Kramer para comparación de medias ($p<0.05$). C =Capacidad. ¹expresada como g de agua absorbidos/g de muestra. ²expresada como g de aceite absorbidos/g de muestra. ³cambio de volumen en mL/g de muestra. ⁴mL de espuma formados/g de muestra. ⁵mL de espuma después de 5 min/g de muestra. ⁶mL de emulsión formada/g de muestra. ⁷mL de emulsión después de 30 min de calentamiento/g de muestra.

Las propiedades tecno-funcionales de las mezclas realizadas con subproductos de cacao indican que tienen potencial de ser utilizadas en la industria alimentaria como un ingrediente con características nutracéuticas y que, tecnológicamente, generará un beneficio en el producto. Debido a la alta demanda actual de “etiquetas limpias” o “*clean labels*” en inglés, la industria alimentaria está en constante búsqueda de ingredientes naturales que puedan suplantar a los aditivos en los alimentos (Polachini *et al.*, 2022). La industria de la panificación es una de las principales afectadas por esta tendencia, lo que conlleva a buscar ingredientes nuevos que puedan ser fuente de proteínas vegetales, actuar como reemplazos de grasa e incluso, que sean emulsificantes (Peris *et al.*, 2019). De esta manera, el alto contenido de proteína, el buen perfil lipídico y las propiedades tecno-funcionales de las mezclas diseñadas sugieren que pueden ser utilizada como reemplazo de un aditivo alimentario en la industria de la panificación.

b. Etapa 2: Modelo murino desincroniza por una dieta alta en grasa

Para la etapa 2 se seleccionó la mezcla 2, la cual pertenece a la formulación de 1 parte de vaina por dos de cascarilla. Esto se realizó con base a la mayor cantidad de compuestos bioactivos, ya que en parámetros como actividad antioxidante y fibra las mezclas no presentaban diferencias significativas. A partir de aquí, a la mezcla 2 se le nombrará *ingrediente de subproductos de cacao*. Después de la revisión de literatura correspondiente se determinó que con un 6% de suplementación del ingrediente de subproductos de cacao se alcanzan las dosis mínimas de fibra y compuestos fenólicos que se han reportado para la modificación de parámetros relacionados con el reloj biológico (Ioniță-Mîndrican *et al.*, 2022; Oishi *et al.*, 2017; Ribas-Latre *et al.*, 2015b; Tahara *et al.*, 2018).

1. Efecto de los diferentes tratamientos sobre parámetros de crecimiento en un modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa

En la **Figura 7** se muestran los resultados del registro de peso durante las 14 semanas de ensayo, hasta 48 h previas al sacrificio. Las semanas correspondientes al periodo de oscuridad constante no se muestran por evitar alterar la respuesta espontánea del ritmo en libre curso. Es posible apreciar que, las primeras tres semanas del ensayo, los animales de experimentación pesaban entre 24 y 25 g, sin presentar diferencias significativas entre grupos ($p>0.05$) lo que indica una aleatorización correcta de los animales. Posteriormente, los grupos con dieta estándar, tanto con como sin el ingrediente adicionado, tuvieron diferencia significativa contra el grupo con dieta alta en grasa ($p<0.05$); sin embargo, el grupo con la dieta alta en grasa suplementada con el ingrediente se mantuvo en medio de estos sin presentar diferencia con ningún grupo ($p>0.05$). El comportamiento anterior permaneció hasta el momento en que los ratones se sometieron a oscuridad constante por dos semanas, posterior a este periodo los grupos con dieta estándar resultaron diferentes estadísticamente a los que consumieron dieta alta en grasa, sin hacer diferencia por el tratamiento con cacao en ambos casos. Estos resultados muestran que la dieta alta en grasa con 6 % de suplementación de ingrediente de cacao está amortiguando parcialmente los efectos de la dieta alta en grasa, sin efectos significativos.

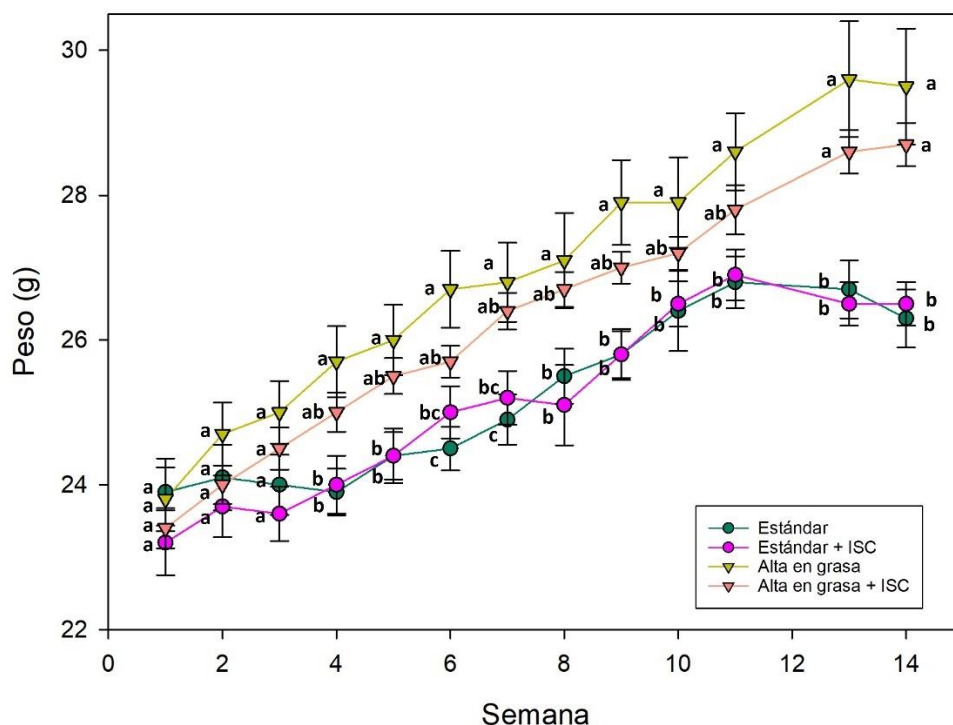


Figura 7. Registro de peso semanal a lo largo de las 12 semanas de ensayo.

Resultados expresados como media \pm error estándar de 12 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas por semana entre grupos $p < 0.05$. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao.

Los resultados mostrados en la **Figura 7** son similares a los encontrados por otros autores, sugiriendo que el efecto puede deberse tanto a la suplementación de fibra, como a la de compuestos fenólicos. [Li et al., \(2018\)](#), utilizando dietas altas en grasa en ratones C57BL/6 encontraron que una suplementación con 10 % de fibra de bambú lleva a un amortiguamiento en la ganancia de peso, el cual depende del tipo de fibra, siendo mayor el efecto ocasionado por la fibra soluble. En un estudio realizado por [Cremonini et al., \(2016\)](#) utilizaron la suplementación con epicatequina, un compuesto presente en el ingrediente de cacao, sobre una dieta alta en grasa, los resultados encontrados son similares a los nuestros en que : los grupos con dieta estándar se mantuvieron diferentes a los altos en grasa y hubo una tendencia a evitar la ganancia de peso en el grupo con dieta alta en grasa.

El registro del consumo de alimento de 24 h se llevó a cabo solo una vez a la semana, con el fin de alterar lo menos posible la conducta de los animales, estos resultados se muestran en la **Figura 8** y contemplan desde la semana 1 hasta la décima semana de ensayo. Se encontró una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el consumo calórico por día de los grupos con dieta estándar (15-18 kcal/día) versus los grupos con dieta alta en grasa (19-26 kcal/día). Esta diferencia entre grupos proviene de las calorías intrínsecas de cada dieta, ya que el consumo de alimento en gramos no mostró diferencias entre grupos ($p > 0.05$).

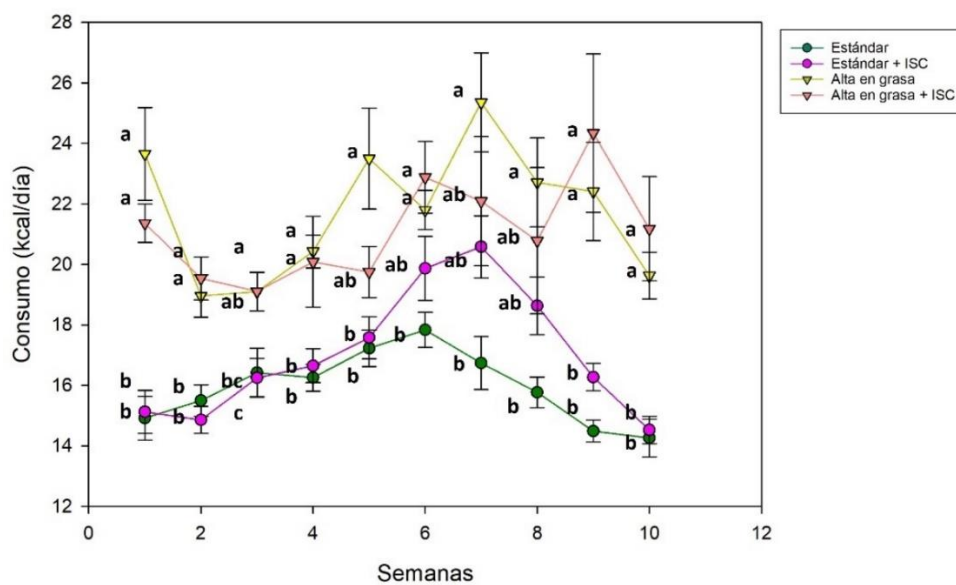


Figura 8. Registro de consumo de alimento de 24 h durante las primeras 10 semanas de ensayo en fotoperiodo de luz/oscuridad regular.

Resultados expresados como media \pm error estándar de 12 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas por semana entre grupos $p < 0.05$. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao.

Los resultados para el consumo de alimento muestran que no hubo una diferencia ($p > 0.05$) ocasionada por la adición del ingrediente de subproductos de cacao a la dieta de los animales, tanto en la dieta alta en grasa como en la dieta estándar. Esto nos sugiere que la adición del ingrediente a las dietas no ocasionó un efecto suficiente para

que los animales se sintieran satisfechos antes, pero tampoco generó que estos consumieran más de lo necesario debido a un incremento en la palatabilidad.

Si se relacionan la ganancia de peso a lo largo de las semanas contra el consumo de alimento de 24 h es posible apreciar que, a pesar de que los animales consumían las mismas calorías en las dietas altas en grasa (con o sin ingrediente de cacao) existió un amortiguamiento en la ganancia de peso. Esto podría deberse a dos mecanismos de acción distintos. El primero sería un efecto de la fibra presente en el ingrediente de cacao, en el cual estas moléculas de fibra atrapan a las moléculas de grasa e impiden su absorción y acumulación en tejidos ([Adam et al., 2015](#)), esto se ha observado en cadenas de fibra como la pectina, un componente relevante del ingrediente de subproductos del cacao. Es por ello que se llevó a cabo una evaluación de la capacidad del ingrediente de cacao para inhibir a la lipasa pancreática, enzima encargada de la absorción de lípidos en el organismo, pero no hubo resultados favorables, encontrándose un porcentaje de inhibición de 0 % (datos no mostrados). El segundo mecanismo de acción que podría estarse presentando es la mediación del gasto energético regulado por la presencia de flavonoides y metilxantinas en el ingrediente de subproductos de cacao ([Xue et al., 2016](#)); sin embargo, para poder determinarlo es necesario que se realicen evaluaciones con genes o marcadores que modulen el gasto energético, como podrían ser los PPARs, encargados del metabolismo de lípidos en tejido adiposo, hígado e hipotálamo.

2. Caracterización de las dietas diseñadas para el modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa

La composición química proximal de las dietas utilizadas se presenta en el Cuadro 14. El contenido de humedad en las dietas resultó bajo (5 %), permitiendo que los pellets formados permanecieran en un buen estado y manteniendo su inocuidad al menos durante una semana. Esto contribuyó a que la actividad locomotora de los animales se alterara solo una vez a la semana. Las dietas altas en grasa superaron el 21 % de lípidos, lo que corresponde a más del 50 % de calorías provenientes de la grasa; de acuerdo con [Song et al., \(2021\)](#) se clasifican en la categoría de dietas altas en grasa, ya que contienen

más del 45 % de sus calorías provenientes de este nutriente. Estas modificaciones en el contenido de lípidos generaron que las dietas altas en grasa tuvieran 1.3 veces más calorías que las dietas estándar.

Cuadro 14. Composición química proximal de las dietas utilizadas para el modelo murino en cada uno de los tratamientos experimentales

	Dietas			
	Estándar	Estándar + ISC	DAG	DAG + ISC
Humedad	5.26 ± 0.07 ^a	5.20 ± 0.04 ^a	4.23 ± 0.02 ^b	4.21 ± 0.05 ^b
Lípidos	5.42 ± 0.04 ^b	6.93 ± 0.27 ^b	21.23 ± 1.12 ^a	22.57 ± 0.39 ^a
Cenizas	7.36 ± 0.02 ^a	7.06 ± 0.08 ^b	6.21 ± 0.08 ^c	6.33 ± 0.02 ^c
Proteínas	25.47 ± 0.17 ^a	24.26 ± 0.09 ^a	22.59 ± 0.20 ^b	21.56 ± 0.57 ^b
Carbohidratos	56.50 ± 0.09 ^a	56.54 ± 0.28 ^a	45.74 ± 0.89 ^b	45.32 ± 0.90 ^b
de los cuales:				
Fibra total	23.49 ± 0.23 ^a	22.50 ± 0.00 ^b	17.82 ± 0.61 ^d	19.65 ± 0.29 ^c
Fibra insoluble	20.17 ± 0.03 ^a	20.15 ± 0.07 ^a	16.16 ± 0.18 ^c	17.43 ± 0.26 ^b
Fibra soluble	3.32 ± 0.20 ^a	2.35 ± 0.06 ^b	1.66 ± 0.43 ^c	2.22 ± 0.02 ^{bc}
Calorías	282.7 ± 0.1 ^a	295.6 ± 1.6 ^a	393.1 ± 5.8 ^b	392.1 ± 2.2 ^b

Resultados expresados como media ± error estándar de dos experimentos independientes por triplicado. Literales diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dietas. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. DAG: dieta alta en grasa

El contenido de carbohidratos en la dieta alta en grasa disminuyó (56 g/100 g en las estándar y 45 g/100 g en las altas en grasa) como efecto de la adición de manteca a la formulación. Para todas las dietas utilizadas en los diferentes tratamientos, la fibra representó alrededor del 40 % de los carbohidratos totales. Al suplementar la dieta alta en grasa con el ingrediente de cacao se logró un incremento del 10 % en la fibra total con

respecto a la dieta alta en grasa sin suplementar. Suplementaciones de al menos un 10 % extra de fibra pueden revertir el efecto de las dietas altas en grasa de forma dependiente al tipo de fibra (Li *et al.*, 2018).

Las dietas altas en grasa presentaron menor cantidad de fibra al compararse con las dietas estándar, sin embargo, cuando se suplementó la dieta alta en grasa con el 6 % de ISC se encontró un incremento del 8 % en la fibra insoluble con respecto a la dieta alta en grasa. Por otro lado, adicionar el ISC en la dieta alta en grasa ocasionó un incremento del 32 % en la fibra soluble al compararla con la dieta alta en grasa sin suplementar. Entre los diversos efectos de las dietas altas en grasa sobre el organismo se encuentra el estado de disbiosis en la microbiota intestinal (Xiao *et al.*, 2017); la disbiosis puede mejorarse a un estado de eubiosis con diferentes tratamientos, entre los cuales se encuentra la suplementación con fibra disponible para la microbiota (Shi *et al.*, 2020). La suplementación con fibra soluble puede incrementar la población de Bacteroidetes y reducir la de Proteobacteria, lo que genera un incremento en la producción de ácidos grasos de cadena corta a nivel colónico (Shi *et al.*, 2020). La producción de ácidos grasos de cadena corta se evaluará en trabajos futuros, con el fin de conocer si éstos son los responsables de modificaciones en la actividad locomotora de los animales.

Se encontró un incremento del 50 % de los fenoles totales (**Figura 9A**) en la fracción ligada por suplementación con 6 % del ingrediente de cacao tanto para la dieta estándar como la dieta alta en grasa. La fracción libre también resultó incrementada en ambos tratamientos (Estándar y alta en grasa) pero en menor proporción. Los resultados en la fracción ligada se deben a que el 95 % de los compuestos fenólicos se encuentran atrapados en la fibra dietaria y solamente son accesibles al romper las cadenas de fibra, resultando parte de la fracción ligada (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014).

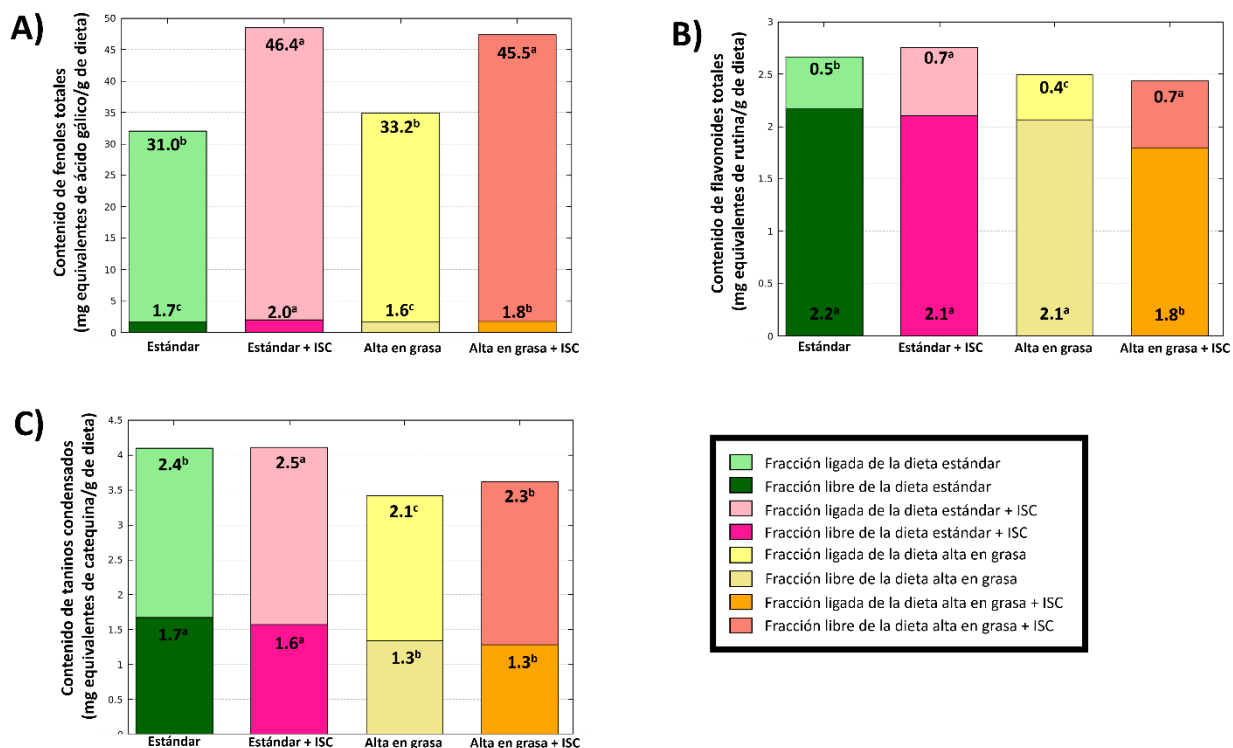


Figura 9. Composición nutracéutica de las dietas utilizadas para el modelo murino. A) Contenido de compuestos fenólicos totales. B) Contenido de flavonoides totales. C) Contenido de taninos condensados. Los resultados se expresan como media de dos experimentos independientes con al menos cuatro repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dietas. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao.

El contenido de flavonoides totales se vio incrementado por la suplementación con el ingrediente de cacao (**Figura 9B**). A diferencia de los compuestos fenólicos totales, los flavonoides se encontraron principalmente en la fracción libre sin presentar diferencias entre tratamientos. Los taninos condensados cuantificados en las diferentes dietas se muestran en la **Figura 9C**. Se encontró que el 66 % de los taninos condensados se encuentran en la fracción ligada, opuesto al comportamiento de los flavonoides; esto se debe a que los compuestos que se encuentran interaccionando con la fibra dietaria son principalmente ácidos fenólicos y taninos, ocasionando que los flavonoides no se liberen al hacer la hidrólisis ([Arranz et al., 2009](#)). La suplementación con el ingrediente de cacao en las dietas mejoró el perfil bioactivo (**Cuadro 15**) al aportar teobromina, catequina,

epicatequina y los ácidos siríngico, cumárico y ferúlico. El perfil fenólico coincide con los compuestos presentes en el ingrediente de cacao.

La suplementación con el ingrediente de cacao produjo que las dietas contuvieran teobromina, una metilxantina que no se encontraba de manera previa en la dieta control (LabDiet Roedent A5001®). En un estudio realizado por [Tanaka et al. \(2022\)](#) se encontró que la suplementación con 0.1 % de teobromina puede inducir cambios en el tejido adiposo y su acumulación; el mecanismo de acción es vía transformación del tejido adiposo blanco a marrón, por PPARs y UCP1. En el caso de los animales del presente proyecto se encontró un amortiguamiento no significativo para la ganancia de peso, pudiendo ser por la presencia de teobromina, pero al encontrarse casi 100 veces menos a las cantidades utilizadas en el estudio de [Tanaka et al. \(2022\)](#) el efecto no fue significativo, además que se contó con una matriz alimentaria compleja.

En los tratamientos experimentales con suplementación con el 6 % del ingrediente se encontró la presencia de catequina y epicatequina, tanto en la fracción libre como ligada. La suplementación con catequina, y algunas antocianinas, puede inducir a la diferenciación del tejido adiposo a tejido adiposo marrón, además de mejorar el estrés oxidativo y reducir factores de inflamación; lo que podría explicar este amortiguamiento en la ganancia de peso encontrado. Por su parte, se ha encontrado que la suplementación con epicatequina puede llevar a una mejora en el estado de eubiosis de la microbiota y fomentar la producción de AGCC, pudiendo actuar posteriormente como sincronizadores de relojes periféricos ([Liu et al., 2019](#); [Tahara et al., 2018](#)).

Cuadro 15. Perfil fenólico y de metilxantinas de las dietas utilizadas en el modelo murino para cada uno de los tratamientos experimentales.

Compuesto (µg/g dieta)	Tiempo de retención (min)	Estándar		Estándar + ISC		Alta en grasa		Alta en grasa + ISC	
		Libres	Ligados	Libres	Ligados	Libres	Ligados	Libres	Ligados
Ácido gálico	6.9	104.07 ± 1.78 ^a	ND	79.55 ± 0.38 ^c	ND	92.07 ± 1.89 ^b	ND	69.91 ± 1.20 ^d	ND
Teobromina	8.2	ND	ND	10.68 ± 0.02 ^a	DLD	ND	ND	7.51 ± 0.09 ^b	DLD
Ácido dihidroxibenzoico	9.5	82.24 ± 2.39 ^a	ND	72.71 ± 1.25 ^b	61.94 ± 0.73 ^b	74.07 ± 1.89 ^b	ND	62.43 ± 1.12 ^c	68.64 ± 0.88 ^a
Catequina	10.5	ND	ND	144.23 ± 0.61 ^a	36.26 ± 2.21 ^a	ND	ND	122.27 ± 4.64 ^b	03.68 ± 2.60 ^b
Epicatequina	11.3	ND	ND	159.81 ± 0.47 ^a	DLD	ND	ND	117.28 ± 2.54 ^b	DLD
Ácido cafeico	11.4	0.81 ± 0.04 ^b	ND	0.25 ± 0.01 ^c	ND	1.01 ± 0.06 ^a	ND	0.13 ± 0.01 ^d	ND
Ácido sinápico	11.7	54.91 ± 0.76 ^a	18.18 ± 0.20 ^a	53.78 ± 0.24 ^a	16.56 ± 0.22 ^b	56.73 ± 1.00 ^a	16.07 ± 0.22 ^b	50.18 ± 1.20 ^a	16.36 ± 0.31 ^b
Ácido siringico	11.8	ND	00.87 ± 0.01 ^a	ND	0.72 ± 0.01 ^b	ND	0.72 ± 0.01 ^b	ND	00.71 ± 0.00 ^b
Ácido cumárico	13.9	ND	ND	12.34 ± 0.11 ^a	ND	ND	ND	11.50 ± 0.19 ^b	ND
Ácido ferúlico	14.9	ND	40.69 ± 0.52 ^a	05.50 ± 0.06 ^a	31.04 ± 0.90 ^c	ND	35.29 ± 0.60 ^b	04.83 ± 0.10 ^b	25.51 ± 0.62 ^d

Resultados expresados como media ± error estándar de dos experimentos independientes por triplicado. Literales diferentes indican diferencias significativas (p<0.05) entre dietas, por compuestos y fracción de extracción (libres o ligados). ISC: Ingrediente de subproductos de cacao

En un ensayo realizado por [Wang et al. \(2018\)](#) se encontró que la suplementación desde 0.5 % de ácido ferúlico en dietas altas en grasa puede generar patrones de crecimiento y consumo de alimento similares a los obtenidos en el presente bioensayo: un amortiguamiento no significativo en la ganancia de peso y el mismo consumo calórico entre la dieta alta en grasa y la dieta alta en grasa suplementada. Esto sugiere que para poder encontrar cambios en la ingesta de alimento o de la ganancia en peso de los animales, la dosis de suplementación con el ingrediente tendría que ser incrementada ya que el ácido ferúlico en la dieta suplementada con el ingrediente apenas alcanza el 0.006%.

La capacidad antioxidante medida por el método de FRAP (**Figura 10A**) mostró un incremento, tanto en la fracción libre como ligada, en las dietas suplementadas con el ingrediente a base de subproductos de cacao, sin encontrar diferencias entre la dieta estándar suplementada y la dieta alta en grasa con suplementación. Se encontró que, tanto para la inhibición de ABTS y DPPH, la suplementación con el ingrediente de cacao incrementó la capacidad de neutralizar los radicales libres en comparación con la dieta correspondiente sin suplementación. Para el caso de la inhibición del radical DPPH esta resultó en un 50 % mayor que la prueba del ABTS, sugiriendo que los compuestos en el ingrediente tienden a actuar mejor por este mecanismo; una mayor capacidad de inhibir al DPPH se ha relacionado con un alto contenido de ácidos fenólicos ([Domínguez-Hernández et al., 2022](#)), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el perfil fenólico donde los compuestos predominantes fueron los ácidos fenólicos.

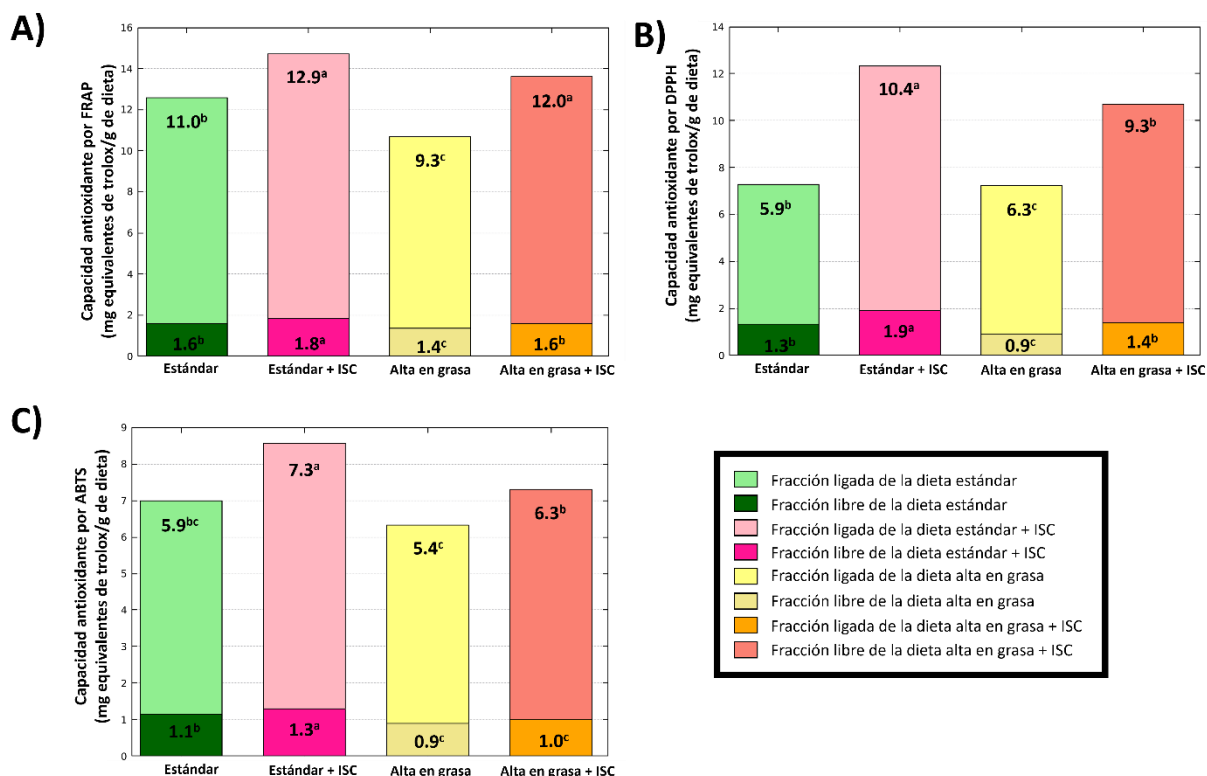


Figura 10. Capacidad antioxidante de las dietas utilizadas para el modelo murino. A) Capacidad antioxidante por FRAP. B) Capacidad antioxidante por DPPH. C) Capacidad antioxidante por ABTS. Los resultados se expresan como media de dos experimentos independientes con al menos cuatro repeticiones cada uno. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre dietas. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao.

3. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la actividad locomotora en un modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa

a) Actividad locomotora de los animales en fotoperiodo regular de 12:12 luz:oscuridad

La actividad locomotora de los animales de experimentación se midió por etapas, primero se consideraron las 10 semanas de fotoperiodo de luz/oscuridad regular (12:12), posteriormente las dos semanas en oscuridad constante. La actividad de las primeras 10 semanas de ensayo se muestra en la **Figura 11**: cada renglón representa 48 h, donde las últimas 24 h de un renglón son las primeras en aparecer en el siguiente renglón de modo que los datos se pueden observar dos veces; arriba

se pueden ver las horas del día donde la línea blanca representa horas de luz (7:00 a 19:00 h) y la línea negra las horas de oscuridad (19:00 a 7:00 h). Se tomaron datos cada 10 min por lo que cada línea representa los eventos cada 10 min en una escala máxima de 50 eventos, los 84 días de evaluación de actividad se muestran hacia abajo. Los actogramas presentados en la **Figura 11** son representativos de cada grupo y representan a una sola unidad experimental.

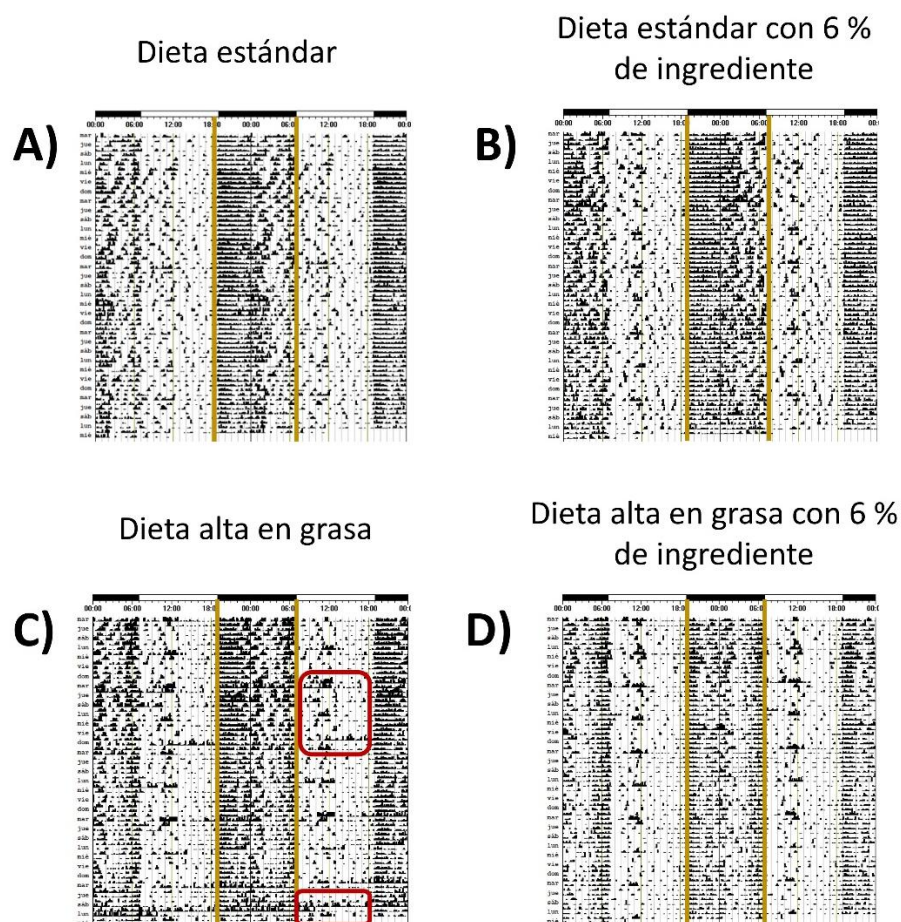


Figura 11. Actogramas representativos de cada grupo experimental durante las 10 semanas de ensayo en fotoperiodo de luz:oscuridad regular (12:12).

A) Dieta estándar. B) Dieta estándar con suplementación al 6 % de ingrediente de cacao. C) Dieta alta en grasa. D) Dieta alta en grasa con suplementación al 6 % de cacao.

Para el grupo con la dieta estándar (**Figura 11A**) podemos apreciar un bloque de actividad marcado durante la fase de oscuridad, típico de los ratones C57BL/6,

además de una ligera anticipación al encendido de luces y posteriormente en la fase de reposo una disminución en la actividad con bloques de baja amplitud distribuidos de manera irregular. El grupo tratado con la dieta estándar suplementado con 6 % del ingrediente (**Figura 11B**) mostró mayor dispersión en la actividad durante la fase activa, pero con menos bloques de actividad esporádica durante la de reposo. Para el tratamiento con dieta alta en grasa (**Figura 11C**) se presentó un decremento en la actividad de manera general, así como una mayor sensibilidad a estímulos externos como era el caso de la limpieza de jaulas. El tratamiento con una dieta alta en grasa suplementada con 6 % de ingrediente de cacao (**Figura 11D**) mostró el mismo decremento en la actividad que el tratado con la dieta alta en grasa, así como la sensibilidad a estímulos externos, además de una anticipación a estímulos externos más marcado que en otros grupos.

Los resultados encontrados para el grupo estándar suplementado con el ingrediente de cacao sugieren que se está teniendo una mejor distribución de la actividad durante la fase activa, lo que sugiere un mejor descanso en la fase de reposo. La sensibilidad a estímulos externos en los grupos alimentados con dieta alta en grasa se relaciona con el desarrollo de síntomas de ansiedad. En un estudio realizado por [Zemdegs et al., \(2016\)](#) se demostró que estos síntomas se intensifican a partir de las 12 semanas de exposición a la dieta alta en grasa. En el caso de la dieta alta en grasa, se aprecian secciones del actograma donde la actividad nunca se detiene, lo que se traduce como una arritmia en la actividad locomotora, sugiriendo una desincronización circadiana ([Brown et al., 2019](#)).

Para la actividad durante la fase de reposo (**Figura 12A**) se encontraron diferencias significativas entre el grupo alto en grasa y el alimentado con dieta estándar suplementada con ingrediente de cacao al 6 % ($p < 0.05$), con 110 y 88 % comparados con el control, respectivamente; sin embargo, estas diferencias no fueron significativas con respecto al control o al grupo tratado con dieta alta en grasa más 6 % de suplementación con ingrediente de cacao. La **Figura 12B** muestra la actividad de los animales de experimentación durante la fase activa; se puede

apreciar que existe una diferencia significativa en el grupo con dieta estándar suplementado con ingrediente respecto a los otros tres grupos ($p < 0.05$), siendo estadísticamente similares el resto de los tratamientos.

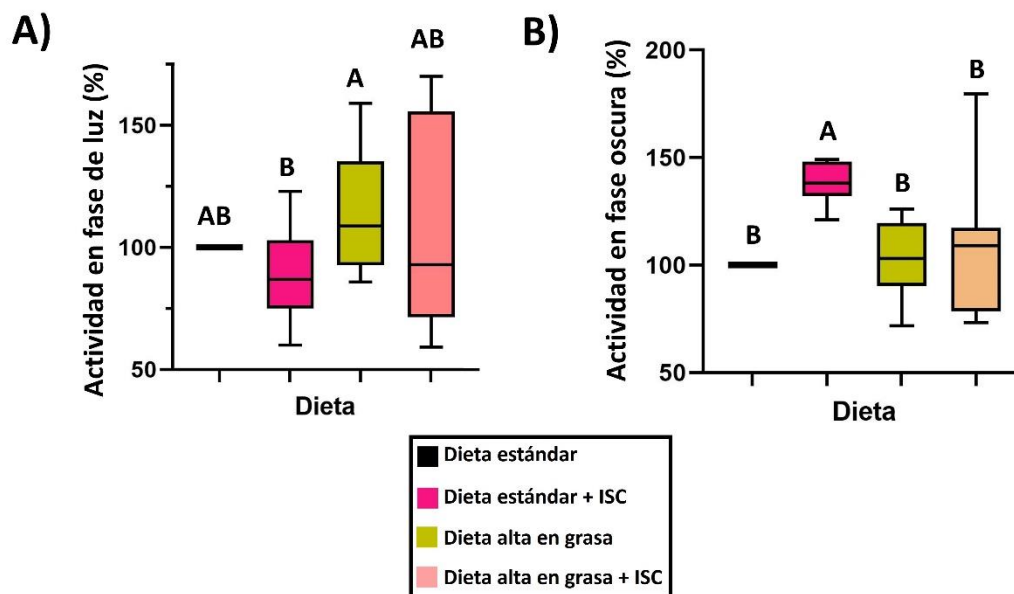


Figura 12. Actividad en la fase de reposo y fase activa de cada grupo experimental durante las 10 semanas de ensayo en fotoperiodo de luz:oscuridad regular (12:12).

A) Actividad durante la fase de luz. B) Actividad durante la fase oscura. Resultados expresados como media del porcentaje con respecto al control \pm error estándar de 12 repeticiones. Letras diferentes indican diferencias significativas por semana entre grupos $p < 0.05$. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao.

En los ciclos de luz/oscuridad regulares, los grupos con la dieta alta en grasa no tuvieron diferencias significativas en sus niveles de actividad con respecto al control, esto puede deberse a que se mantuvo un fotoperiodo con ciclos de 12 horas; estos ciclos de luz podrían haber estado enmascarando la desincronización causada por la dieta alta en grasa; los primeros experimentos en cronobiología indican que la luz es el principal *Zeitgeber* interno, por lo que a pesar de existir un efecto de la grasa

sobre la sincronización circadiana esta se puede ver enmascarada (Daan *et al.*, 1976). A pesar de lo anterior, los resultados nos sugieren que existe una tendencia a la desincronización por la dieta alta en grasa, este comportamiento está asociado con el efecto de la grasa sobre el reloj y se ha reportado con anterioridad que este efecto se puede presentar desde la primera semana de exposición, resultando en un efecto acumulable (Brown *et al.*, 2019).

Cuando se apagan las luces los ratones son activos y consumen la mayoría de su alimento; al encenderse las luces comienza la fase diurna y los animales descansan. El desfase del inicio de la actividad con respecto al apagado de las luces se muestra en la **Figura 13**: en el eje de las y se muestran los minutos desfasados con respecto al encendido de luces, en caso de que el animal tardara más tiempo en comenzar su bloque de actividad el número se consideró como positivo; en caso opuesto donde los animales comenzaban su actividad previa al apagado de luces, se considera un número negativo.

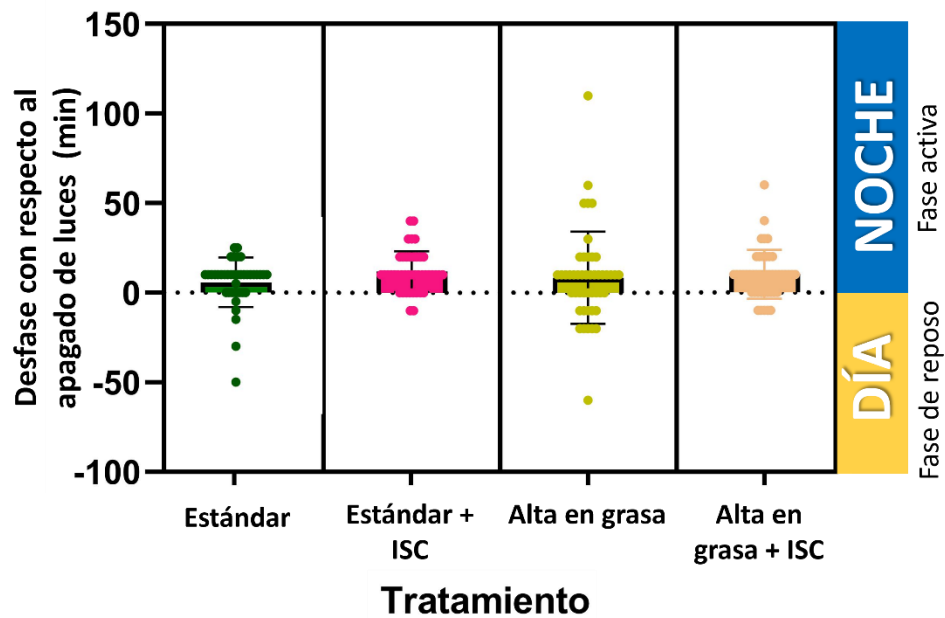


Figura 13. Desfase de la actividad con respecto al apagado de las luces (min) de los diferentes tratamientos experimentales.

Retrasos en el inicio de actividad se muestran como números positivos mientras que adelantos a la misma en números negativos. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar de siete animales experimentales, considerando seis días para cada animal. Los puntos representan una medición de un día de un animal diferente. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao.

De acuerdo con [Brown et al. \(2019\)](#) y su guía para definir los patrones de actividad en condiciones de luz:oscuridad 12:12, el desfase de actividad puede indicar una desincronización cuando existe una mayor variabilidad en los datos. Los ratones alimentados con la dieta estándar presentaron una desviación estándar de 13 min con un par de unidades experimentales que tienen un adelanto al encendido de luces. Por otro lado, la dieta estándar suplementada con ingrediente de cacao al 6 % muestra una desviación de 11 min, en este caso se observa más una tendencia a retrasar el inicio de actividad en vez adelantarla. Esta desviación estándar menor con respecto al grupo control nos sugiere que el ingrediente de cacao, en condiciones de una dieta y estilo de vida saludable, puede ayudar a reducir la dispersión en los patrones de inicio de actividad.

Para el caso del desfase de actividad en la dieta alta en grasa (**Figura 13**) se encontró una desviación de casi 26 min, además que, al momento de recolectar los datos, algunos animales no tenían fin o inicio en su actividad, sugiriendo la falta de un ritmo que modulara la actividad locomotora de este grupo. Además, este grupo presentó tanto un adelanto como un retraso mayor a una hora respecto al encendido de las luces. El grupo con la dieta alta en grasa suplementada con ingrediente mostró una desviación estándar parecida al grupo control (13.5 min) y tuvo una tendencia a retrasarse al apagado de luces en vez de adelantarse, lo que sugiere que se logró evitar el desfase de actividad ocasionado por la dieta alta en grasa, demostrando una vez más la capacidad del ingrediente de cacao de proteger contra los efectos de la dieta alta en grasa.

Como se mencionó anteriormente, aquellos ciclos biológicos que duran menos de 24 horas se conocen como ciclos ultradianos, los brotes dispersos de actividad espontánea son un ejemplo de patrones ultradianos. Estos brotes aparecen en los ratones de la cepa C57bl/6, tal y como se aprecia en los actogramas de la **Figura 11**, donde el grupo control presenta brotes de actividad periódicamente.

Los ciclos ultradianos del grupo alimentado con dieta estándar (**Figura 14**) mostraron ser de una duración de 4 a 6 h (frecuencia de 5) y sin incidencia de ciclos de 2 a 4 h. La dieta estándar suplementada con el 6 % del ingrediente mostró ciclos de duración de 8 a 10 h y de 10 a 12 h, sugiriendo que se están teniendo brotes espontáneos de actividad con menor frecuencia; lo que podría hablar de un mejor descanso durante la fase de reposo, lo que concuerda con el patrón de actividad observado en el actograma de luz:oscuridad (**Figura 11**). La dieta alta en grasa defragmenta los bloques de actividad en brotes de de 2 a 4 horas y baja o nula incidencia de ciclos más largos. La suplementación con el ingrediente de cacao a la dieta alta en grasa logró obtener un patrón de frecuencias similar al tratamiento con la dieta estándar al prácticamente erradicar los ciclos de 2 a 4 horas e incrementando los de 6 a 8; además se vuelve a observar un incremento en los ciclos de 10 a 12, como al suplementar la dieta estándar con el ingrediente, lo que

sugiere que este efecto es propio de los compuestos presentes en los subproductos de cacao.

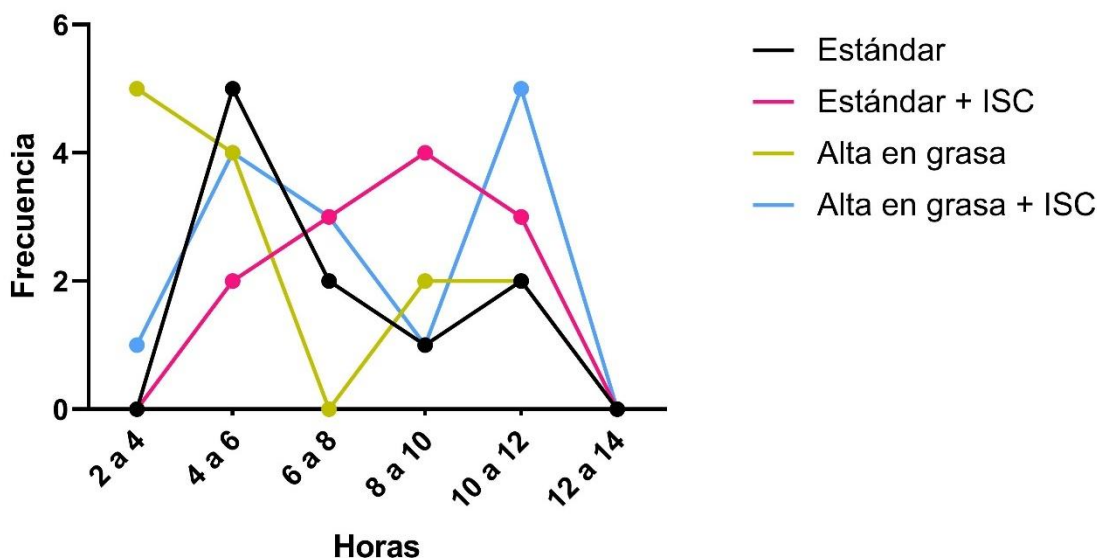


Figura 14. Ciclos ultradianos de actividad locomotora en los diferentes grupos experimentales después de 10 semanas de intervención.

Los datos se muestran como frecuencia (eje y) en cada rango de horas (eje x). Grupos con dieta estándar n=7. Grupos con dieta alta en grasa n=8. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao.

Los brotes de actividad son naturales en los ratones C57bl/6, sin embargo, un aumento en la frecuencia, pero con patrones de corta duración está relacionado con un estado de desincronización circadiana ([Brown et al., 2019](#)). Analizando los ciclos ultradianos presentados por los cuatro grupos experimentales se observa que la suplementación con el ingrediente de cacao revierte los brotes de alta frecuencia relacionados con la desincronización circadiana inducida por una dieta alta en grasa.

Anteriormente, [Oishi et al. \(2020\)](#) evaluaron el efecto de la suplementación con cocoa al 2 % en ratones alimentados con una dieta alta en grasa y fructosa. Los autores encontraron que la proporción de actividad durante el día disminuyó en

comparación con la noche, esto al mejorar la calidad del sueño y sin afectar los ciclos de actividad en un tratamiento con dieta estándar. Estos resultados coinciden con el presente trabajo, al suplementar con el ingrediente de subproductos de cacao se encontró la reversión de la desincronización y los resultados de la dieta estándar suplementada sugieren la mejora en la calidad del sueño. El ingrediente de cacao comparte algunos compuestos bioactivos con la cocoa ([Oddoye et al., 2013](#)), lo que podría llegar a explicar estos resultados y sugerir un mecanismo de acción similar

Estos resultados indican la posibilidad de un efecto a nivel reloj biológico, pero para comprobarlo fue necesario realizar un análisis sin luz, en oscuridad constante.

b) Actividad locomotora de los ratones en condiciones de oscuridad constante por 14 días

Los resultados del análisis de actividad en libre curso, es decir en oscuridad constante, se muestran en la **Figura 15** y son actogramas (derecha) representativos de cada grupo. Los actogramas presentados muestran 48 h cada renglón, repitiéndolas 24 h del final del renglón en el siguiente, se presentan 14 días de oscuridad constante hacia abajo. Al lado izquierdo del actograma se presenta un periodograma de Lomb-Scragle donde el pico máximo en la gráfica representa el periodo de los animales, en caso de existir múltiples picos indica la presencia de más de un ritmo de actividad a lo largo del día. La línea roja superior de los actogramas representa la hora del día, en negro representado las horas que pertenecían al periodo de oscuridad y la blanca al periodo de luz, previo a la oscuridad constante.

El actograma del tratamiento con la dieta estándar (**Figura 15A**) indica un periodo corto, esto se aprecia como el bloque de la actividad se va recorriendo hacia la izquierda, indicando un periodo menor a las 24 h del día; el periodograma muestra un solo pico indicando que los animales tenían un solo ciclo de actividad. El tratamiento de la dieta estándar con suplementación del ingrediente (**Figura 15B**)

resultó similar a la dieta estándar, sugiriendo que el ingrediente de subproductos de cacao en un nivel de 6 % de suplementación no afecta de manera negativa al reloj biológico. El grupo tratado con la dieta alta en grasa (**Figura 15C**) mostró un actograma desplazado a la derecha, es decir un periodo más largo que 24 h ([Brown et al., 2019](#)); posteriormente se observa actividad durante todo el día indicando una falta de regulación circadiana, es decir, desincronización del reloj, además su periodograma muestra múltiples picos de actividad a lo largo del día lo que sugiere una disrupción en el ritmo circadiano de actividad locomotora. Por último, el tratamiento con el ingrediente de cacao sobre una dieta alta en grasa (**Figura 15D**) logró revertir el efecto de la grasa sobre la desincronización del reloj, permitiendo obtener tanto un actograma como un periodograma similar al grupo estándar.

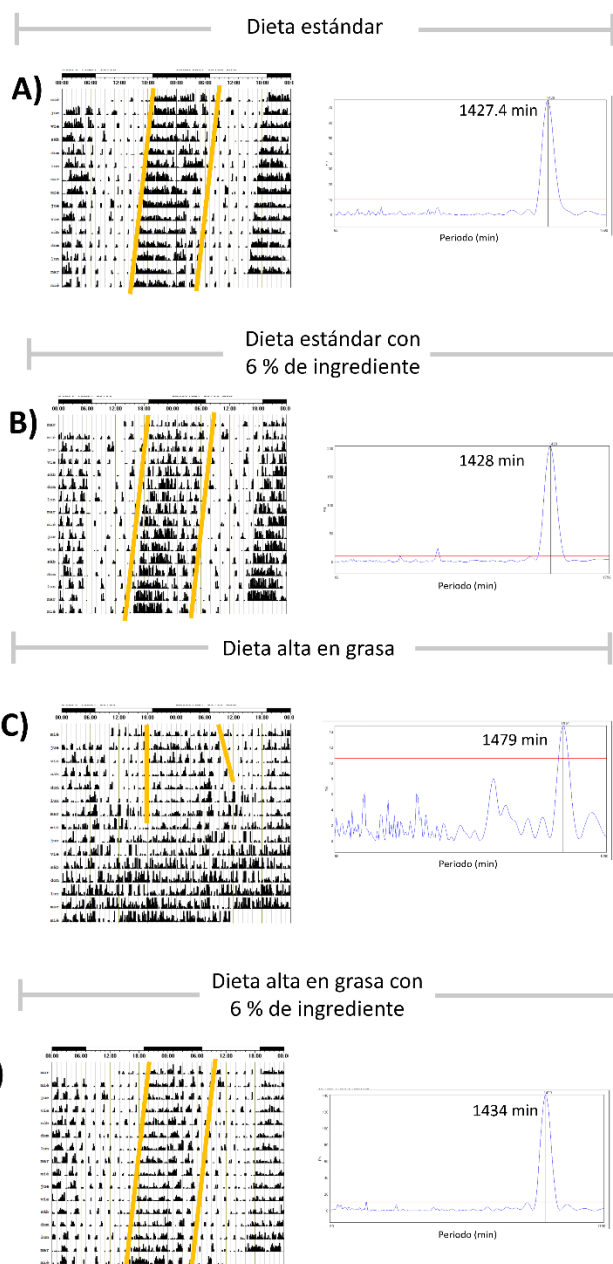


Figura 15. Actogramas (izquierda) y periodogramas de Lomb-Scargle (derecha) en oscuridad constante por 14 días.

Actogramas y periodogramas correspondientes, representativos de cada grupo. A) Grupo con dieta estándar. B) Grupo con dieta estándar suplementada con 6 % de ingrediente de cacao. C) Grupo con dieta alta en grasa. D) Grupo con dieta alta en grasa suplementada con 6 % de ingrediente de subproductos de cacao. Líneas amarillas en el actograma representan el principal bloque de actividad a lo largo del ensayo. Línea roja en el periodograma indica significancia ($p < 0.05$).

El análisis numérico de los periodogramas de Lomb-Scargle se muestra en la **Figura 16**. Ambos tratamientos con dieta estándar tuvieron un periodo (duración del ciclo circadiano) de 23.8 h ± 0.03 , relacionable con lo observado en los actogramas (**Figura 15**) donde se aprecia un periodo menor a 24 h. El tratamiento con la dieta alta en grasa alarga el periodo del ritmo (24.6 h ± 0.51), lo que es consistente con otros estudios de desincronización en los animales (Brown et al., 2019), resultando una diferencia significativa respecto a los demás grupos ($p < 0.05$). El tratamiento de la dieta alta en grasa con suplementación al 6 % con ingrediente de subproductos de cacao logró reestablecer el valor del periodo (23.9 h), equiparándolo con el grupo control ($p > 0.05$), lo que sugiere que está revirtiendo la desincronización circadiana generada por el efecto de la grasa; este es el primer reporte de una matriz alimentaria compleja en revertir modificaciones en el periodo ocasionadas por una dieta alta en grasa.

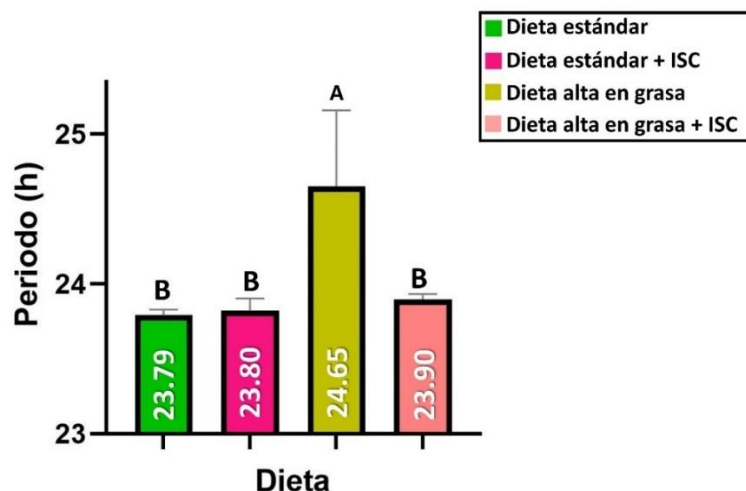


Figura 26. Valor numérico del periodo de los diferentes grupos experimentales del modelo murino durante el experimento en oscuridad constante por 14 días.

Los resultados se muestran como media \pm error estándar de 12 unidades experimentales. Letras diferentes indican diferencias significativas por prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.05$). ISC, Ingrediente de subproductos de cacao.

Las dietas altas en grasa pueden generar este efecto observado sobre el periodo a partir de una semana de exposición, siendo mayor el efecto conforme la exposición se prolonga ([Kohsaka et al., 2007](#)). Se ha demostrado que este efecto del consumo excesivo de grasa puede ser revertido si se suspende la exposición a estas ([Branesky et al., 2015](#)). Para el caso de los resultados del presente trabajo, la suplementación con el ingrediente logró equiparar el efecto de un cambio de hábitos donde se reduce el consumo de grasa, pero sin suprimir la ingesta de este nutriente. Los resultados obtenidos son similares a lo obtenido por [Soliz-Rueda et al., \(2022\)](#), donde al suministrar 0.75 mg de compuestos fenólicos de extracto de semilla de uva al día, lograron revertir el efecto en la actividad locomotora ocasionado por la exposición a la grasa y cambios en el fotoperiodo. En este caso la dosis de compuestos fenólicos totales para la dieta alta en grasa suplementada con el ingrediente fue de 212.85 mg/día, si bien es una cantidad más alta que la suministrada por [Soliz-Rueda et al., \(2022\)](#), solamente el 4 % de los compuestos fenólicos de la dieta alta en grasa suplementada están de forma libre, los demás se encuentran ligados a la matriz alimentaria, por lo que es necesario que se liberen durante el proceso de digestión. Recordando la composición del ingrediente de cacao, este tiene una un perfil fenólico similar al extracto de semilla de uva, por lo que los resultados similares al estudio de [Soliz-Rueda et al., \(2022\)](#) son esperados ya que los mismos compuestos podrían estar modulando al reloj, ya sea de manera central o periférica.

c. Etapa 3: Evaluaciones ex-vivo a los tejidos colectados del modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa

1. Efecto del consumo del ingrediente de cacao sobre parámetros morfológicos y la química sanguínea de un modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa

El registro de peso al momento de la eutanasia se presenta en el Cuadro **16**; además se muestra el peso del tejido adiposo gonadal y del hígado como indicadores de obesidad. La eutanasia a medio día mostró que los animales alimentados con la dieta alta en grasa resultaron con un mayor peso corporal que los alimentados con la dieta estándar ($p < 0.05$); específicamente el grupo suplementado con el ingrediente de cacao presentó un amortiguamiento, siendo estadísticamente igual a la dieta estándar y la dieta alta en grasa. Este comportamiento se mantuvo desde la tercera semana de ensayo, indicando que el ingrediente de cacao amortigua la ganancia de peso. Sin embargo, estos resultados también sugieren, que, para tener resultados significativos sobre el peso corporal, se requiere de una mayor suplementación, ya sea en tiempo o en proporción del ingrediente a las dietas. Durante la eutanasia a medianoche todos los grupos tuvieron un peso estadísticamente similar debido posiblemente a la constante alimentación durante la noche.

Cuadro 16. Parámetros morfológicos al momento del sacrificio para los diferentes tratamientos experimentales.

Dieta	Tiempo de sacrificio	Peso ratón¹	Peso hígado¹	Peso tejido adiposo gonadal¹
Estándar	ZT6	27.4 ± 0.5 ^b	1.6 ± 0.1 ^a	0.2 ± 0.0 ^{bc}
	ZT18	27.6 ± 0.5 ^a	1.5 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^b
Estándar + ISC	ZT6	26.8 ± 0.5 ^b	1.4 ± 0.1 ^a	0.1 ± 0.0 ^c
	ZT18	28.1 ± 0.7 ^a	1.4 ± 0.1 ^a	0.2 ± 0.0 ^b
DAG	ZT6	30.8 ± 0.9 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	0.4 ± 0.1 ^a
	ZT18	29.7 ± 1.2 ^a	1.3 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.1 ^a
DAG + ISC	ZT6	29.0 ± 0.3 ^{ab}	1.4 ± 0.1 ^a	0.3 ± 0.0 ^a
	ZT18	29.3 ± 0.4 ^a	1.3 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^a

Resultados expresados como media ± error estándar de al menos seis ejemplares experimentales por hora de sacrificio. ¹: peso en gramos DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio al medio día. ZT18: Sacrificio a medianoche. Letras diferentes indican diferencias significativas por columna, entre grupos, por prueba de Tukey (p<0.05).

Al momento de la eutanasia se registró el peso del hígado, encontrándose similares a los que corresponden a ratones de 26 semanas de edad, que representan del 3 al 5% del peso corporal ([Song et al., 2021](#)). En la eutanasia a medio día (ZT6) el tejido adiposo gonadal presentó diferencias significativas entre la dieta alta en grasa y las dos dietas estándar; sin embargo, el tratamiento de dieta alta en grasa con ingrediente no evitó la acumulación de tejido adiposo, solo se presentó un amortiguamiento similar a la ganancia de peso.

Los parámetros bioquímicos de la sangre entre los diferentes grupos experimentales a dos horas distintas de eutanasia (medio día y medianoche) se muestran en el Cuadro 17. El colesterol total de los animales, tanto los alimentados

con dietas estándar como altas en grasa, coincide con lo reportado en la literatura para animales de la misma edad (He *et al.*, 2020). Se encontró una disminución no significativa en los triglicéridos en las dietas suplementadas con el ingrediente (tanto en el ZT6 como en el ZT18), sugiriendo que el metabolismo de los lípidos podría estar resultando medianamente beneficiado por la adición del ingrediente de cacao a la dieta. Anteriormente se ha evaluado la capacidad de los flavonoides de cacao sobre la lipasa, encontrando que estos inhiben su actividad, siendo un mecanismo antiobesogénico y llevando a la reducción de los triglicéridos en sangre (Igbayilola *et al.*, 2024); como se mencionó para este estudio se realizó una medición de la inhibición de lipasa pancreática y el ingrediente por completo no mostró actividad, sugiriendo que la complejidad de la matriz alimentaria que es el ingrediente solo lleva a esta reducción no significativa de los triglicéridos.

Los niveles de glucosa (**Cuadro 17**) resultaron más altos para los grupos altos en grasa al compararse con los estándares; esto coincide con los resultados obtenidos por He *et al.* (2020) para ratones sanos y obesos de una edad similar. Se encontró además una ligera disminución no significativa de la glucosa circundante cuando se suplementó con el ingrediente de cacao. Este comportamiento es similar a lo obtenido por Liu *et al.* (2020), donde al suministrar polvo de cereza a ratones alimentados con dieta alta en grasa se obtuvo una disminución no significativa en los niveles de glucosa.

Cuadro 17. Parámetros bioquímicos al momento del sacrificio del modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa.

Dieta	Hora de sacrificio	Colesterol total	HDL	Glucosa	No-HDL	Triglicéridos
Estándar	ZT6	100.8 ± 0.6 ^b	55.0 ± 9.3 ^b	164.2 ± 8.5 ^{bc*}	45.8 ± 9.3	144.5 ± 6.5 ^{ab}
		100.0 ± 0.0 ^b	61.8 ± 1.8 ^b	136.7 ± 6.4 ^b	38.2 ± 1.8	163.6 ± 10.8 ^a
	ZT18	114.2 ± 8.1 ^{ab}	47.8 ± 7.1 ^b	156.7 ± 4.7 ^c	66.4 ± 10.7	107.6 ± 14.2 ^b
		100.0 ± 0.0 ^b	53.2 ± 4.2 ^b	150.0 ± 5.6 ^b	46.8 ± 4.2	150.3 ± 11.2 ^a
DAG	ZT6	119.4 ± 4.5 ^a	92.4 ± 1.5 ^a	198.1 ± 6.3 ^{a*}	27.0 ± 4.8	126.7 ± 11.4 ^{ab}
		119.2 ± 5.2 ^a	88.0 ± 1.6 ^a	174.2 ± 7.6 ^a	31.2 ± 5.6	165.0 ± 15.8 ^a
	ZT18	117.4 ± 3.2 ^{ab}	88.0 ± 2.8 ^a	187.0 ± 8.4 ^{ab}	29.4 ± 4.2	155.7 ± 15.6 ^a
		120.6 ± 3.4 ^a	91.2 ± 1.7 ^a	184.2 ± 4.6 ^a	29.4 ± 3.8	148.6 ± 20.7 ^a

Resultados expresados como media ± error estándar de al menos seis ejemplares experimentales por hora de sacrificio. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Eutanasia al mediodía. ZT18: Eutanasia a medianoche. Literales diferentes indican diferencias significativas por columna, entre grupos, por prueba de Tukey ($p < 0.05$). * indica diferencias día/noche con prueba de t^* ($p < 0.05$).

2. Expresión de genes de reloj y controlados por reloj en tejidos periféricos

El patrón de la expresión de los genes de reloj tiene cambios durante el día. Los genes de reloj presentan un comportamiento senoidal, pareciéndose más a una onda que a niveles de expresión constantes, los términos a utilizar se muestran en la **Figura 17**. Cuando en esta sección se hable de la diferencia que existe entre la cresta y el valle de las ondas senoidales, estaremos hablando de *oscilación* (**Figura 17A**), de forma que exista oscilación fuerte y débil. Hablaremos de niveles de

expresión (**Figura 17B**) se refiere a la distancia entre la cresta de la onda desde el cero, sugiriendo que exista expresión incrementada y disminuida. Por lo tanto, pueden existir comportamientos como combinaciones como la oscilación débil con niveles de expresión altos (**Figura 17C**) u oscilación alta con niveles de expresión bajos, entre otros. Así mismo puede existir lo que se conoce como cambio de fase, donde el gen se comporta de la misma forma, tanto en niveles de expresión como la oscilación, pero se presentan sus máximos y mínimos en otro momento del día.

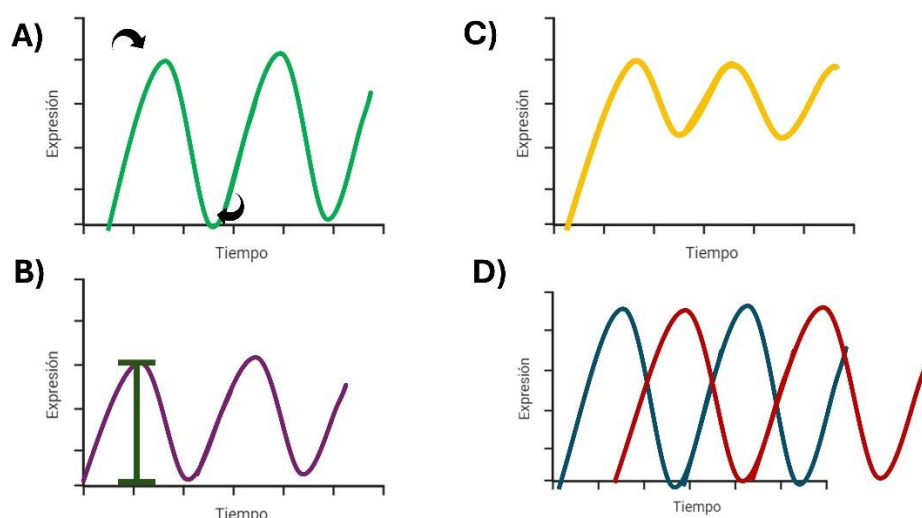


Figura 17. Comportamiento habitual de los genes de reloj.

A) Oscilación de referencia. **B)** Representación del nivel de expresión. **C)** Ejemplificación altos niveles de expresión con baja oscilación. **D)** Ejemplo de un cambio de fase donde: línea azul es el comportamiento esperado, línea roja es el comportamiento obtenido.

Para esta sección, las gráficas de expresión de genes de reloj (**Figura 18-21**) tienen el siguiente formato: en el eje de las abscisas se presenta el tiempo de sacrificio donde el sacrificio al medio día se presenta como ZT6 se, y el sacrificio a medianoche como ZT18, considerando al ZT0 como la hora de encendido de luces (7:00 am); además se agrupan dependiendo de la dieta experimental correspondiente (Estándar, estándar + ISC, alta en grasa, alta en grasa + ISC). En el eje de las ordenadas se presenta la expresión relativa calculada por el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ usando como gen constitutivo la expresión de *B2m* y normalizando a valor de uno la expresión del grupo con dieta estándar en el tiempo de día (ZT6).

a) *Modulación de genes en hígado*

La **Figura 18** presenta la expresión relativa de dos genes de reloj, *Bmal1* (**Figura 18A**) y *Per2* (**Figura 18B**), así como un gen controlado por reloj, *PPAR α* (**Figura 18C**), en hígado.

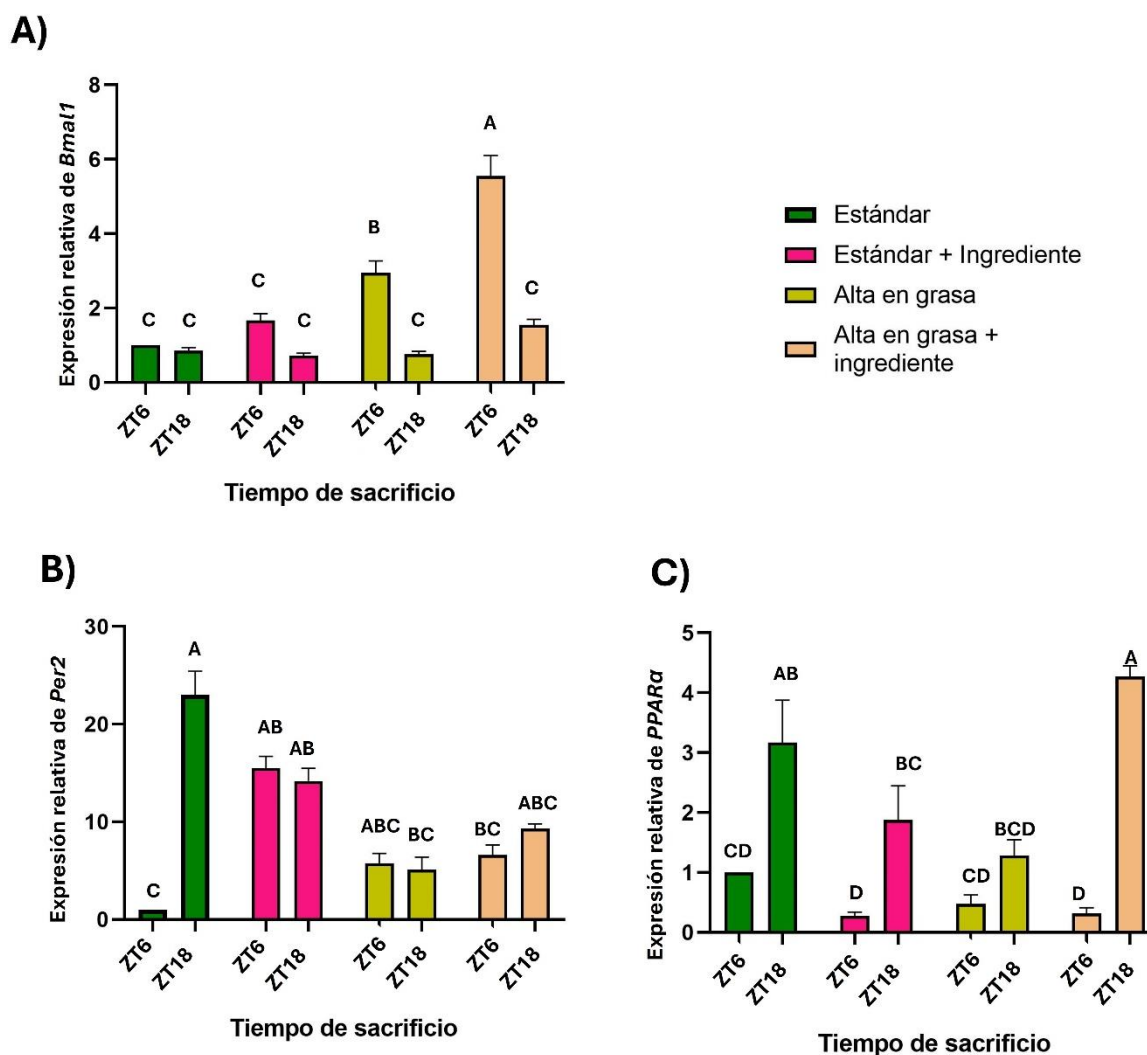


Figura 18. Expresión relativa de genes de reloj y genes controlados por reloj en hígado.

A) Expresión relativa de *Bmal1*. **B)** Expresión relativa de *Per2*. **C)** Expresión relativa de *PPAR α* . Los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n=6$) y expresados en función del gen *B2m*, normalizando a uno la expresión del grupo con dieta estándar en el día. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempo de sacrificio. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

La expresión relativa de *Bmal1* en hígado (**Figura 18A**), en el grupo de la dieta estándar, presentó niveles bajos de expresión y nula oscilación, con tendencia a presentar valores más altos de noche comparados con el día. A pesar de que en la dieta estándar con el ingrediente, el cambio en la oscilación no es significativo ($p>0.05$), se puede apreciar que la expresión de *Bmal1* tiende a ser mayor en ZT6 que en ZT18, sugiriendo que el ingrediente de subproductos de cacao está provocando un cambio en el ritmo de la expresión de este gen. La dieta alta en grasa ocasionó la oscilación *Bmal1*, con mayor expresión en el ZT6 respecto al ZT18 ($p<0.05$) (**Figura 18A**), y durante el día los niveles de expresión incrementaron en comparación con la dieta estándar ($p<0.05$). La dieta alta en grasa con el ingrediente también incrementó los niveles de expresión de *Bmal1* durante el ZT6 ($p<0.05$), incluso más que solo la dieta alta en grasa ($p<0.05$); sugiriendo que el ingrediente de cacao está ocasionando un cambio de fase en la expresión de *Bmal1*.

De acuerdo con un ensayo realizado por [Cui et al. \(2022\)](#) en ratones de edad similar, el máximo nivel de expresión para *Bmal1* se alcanza al encendido de luces (ZT=0) y el mínimo en el apagado (ZT=12). La falta de variación en *Bmal1* en los ratones en dieta estándar podría deberse a que se evaluaron dos tiempos en que el momento en que la expresión del gen comienza a disminuir a mitad del día y cuando empieza a aumentar su expresión de nuevo a mitad de la noche ([Hsieh et al., 2010](#)). Por otro lado, las dietas altas en grasa durante una exposición prolongada pueden ocasionar aumento en la expresión de *Bmal1* ([Hsieh et al., 2010](#)), así como un cambio en su fase; algo similar a lo obtenido en este trabajo para la dieta alta en grasa donde se aprecia un incremento en la expresión, así como el desplazamiento del máximo en la expresión de *Bmal1*.

La suplementación con el ingrediente de cacao, tanto en la dieta estándar como en la dieta alta en grasa, incrementa la expresión y cambia la fase de *Bmal1* (mayor en ZT6 que en ZT18). De acuerdo con el trabajo realizado por [Koronowski et al. \(2019\)](#), los compuestos lipídicos provenientes de los alimentos tienen su

máxima concentración hepática en el ZT6 y ZT18, tiempos en los que se evaluó la expresión de genes en este trabajo, estando disponibles para ejercer efectos sobre el metabolismo. Se ha reportado que ácidos grasos insaturados pueden llevar a la sobreexpresión de *Bmal1* vía activación de sirtuinas, por acumulación excesiva de lípidos en hígado (Tal *et al.*, 2019). De esta forma se podría explicar por qué el ingrediente por sí solo tiene un efecto sobre la expresión de *Bmal1*, posiblemente por las cantidades altas de ácidos grasos insaturados presentes en la cascarilla de cacao (Okiyama *et al.*, 2017) que representan el 67 % de los lípidos en el ingrediente de subproductos de cacao.

La expresión de *Per2* en hígado (**Figura 18B**) en el grupo con la dieta estándar mostró el comportamiento esperado: una oscilación robusta con mayor expresión ($p < 0.05$) al tiempo ZT18 comparándola con el ZT6 (Cui *et al.*, 2022). La suplementación del ingrediente de cacao en la dieta estándar generó una pérdida en la oscilación, con valores iguales ($p > 0.05$) tanto de día como de noche, encontrándose 27 % por debajo de la expresión de la dieta estándar durante en el ZT18. La dieta alta en grasa también eliminó la oscilación de la expresión de *Per2*, sin embargo, en este caso también se redujeron sus niveles de expresión, siendo igual a los del grupo de la dieta estándar en ZT6 ($p > 0.05$). Si bien después de administrar la dieta alta en grasa con el ingrediente de subproductos de cacao hubo una reducción en la expresión de *Per2* en ZT18 y un aumento durante el ZT6, es posible apreciar una tendencia no significativa a recuperar la oscilación, presentando una tendencia similar a la del grupo de dieta estándar.

Es la primera vez que se reporta el efecto de los subproductos de cacao sobre el reloj biológico; sin embargo, los compuestos activos presentes en estos han sido probados anteriormente. Ribas-Latre *et al.* (2015a) evaluaron el efecto de la suplementación con GSPE (extracto de semilla de uva), el cual incrementó la expresión de *Per2* a mitad del día. Los compuestos presentes en el GSPE fueron los responsables de este incremento, siendo más relevante la dosis de 1.13 mg de epicatequina al día, en este estudio el suplementar con 6% de ingrediente de cacao

llevó a una dosis de 1.99 mg de epicatequina al día (Velásquez-Jiménez et al., 2023). La dosis de epicatequina supera a lo reportado por la literatura, pudiendo ser la responsable del incremento de *Per2* en el ZT6.

Similar a lo obtenido en este trabajo, las dietas altas en grasa han demostrado reducir la expresión de *Per2* (Kohsaka et al., 2007), así como evitar su oscilación llevándolo a un estado de arritmia (Sun et al., 2015). De acuerdo con Kohsaka et al. (2007), la falta de ritmo en la expresión de *Per2* en hígado se relaciona con un periodo de actividad locomotora más largo cuando los animales son expuestos a oscuridad constante. Si bien la suplementación del ingrediente en la dieta alta en grasa no provocó cambios significativos ($p > 0.05$), con respecto a la dieta alta en grasa si generó una tendencia a recuperar la oscilación de *Per2*. Estos cambios en *Per2* podrían ser responsable de la recuperación de los patrones de actividad locomotora en el grupo con dieta alta en grasa suplementado con el ingrediente, pues se encontró menor actividad durante la fase de reposo en fotoperiodo de luz/oscuridad (12:12h), menor número de ciclos ultradianos, inicio de actividad más pronto al apagar las luces y un periodo en oscuridad constante más corto, esto coincide con los resultados de Kohsaka et al. (2007) donde se menciona que al reestructurar el ritmo de *Per2*, se refleja en la actividad locomotora.

La expresión relativa en hígado de *PPAR α* se muestra en la **Figura 18C**. Este gen es controlado por reloj y modula el metabolismo lipídico; se seleccionó la evaluación de este gen debido a que los animales del grupo alto en grasa suplementado con el ingrediente presentaron un amortiguamiento en la ganancia de peso, pero sin modificarse la ingesta calórica. Dado que los animales consumían la misma cantidad de calorías, se hipotetizó que existe una modulación del metabolismo lipídico debido al ingrediente de cacao, medir la expresión de *PPAR α* daría un panorama para considerar evaluar cambios en el metabolismo de lípidos. En el grupo de la dieta estándar este gen presenta una oscilación significativa ($p < 0.05$) con valores de expresión más altos para ZT18 que en ZT6, comportamiento que se mantuvo al suplementar con el ingrediente de cacao; sin

embargo, los valores de expresión relativa se vieron ligeramente disminuidos ($p > 0.05$). La dieta alta en grasa ocasionó disminución en la oscilación, sin diferencia estadística entre ZT6 o ZT18, además de disminuir la expresión de este gen (respecto a la dieta estándar). La suplementación con el ingrediente logró revertir el efecto de la dieta alta en grasa, recuperando la oscilación ($p < 0.05$) y la expresión de *PPAR α* , con niveles expresión similares al grupo de la dieta estándar.

La expresión de *PPAR α* sigue un comportamiento circadiano que depende directamente de la expresión de *Bmal1* y *Clock*, además *PPAR α* modula la expresión de *Per2* (Chen *et al.*, 2014). La expresión máxima de *PPAR α* se da durante la primera fase de la noche, similar a *Per2*, esto se debe a que es el encargado de regular algunas enzimas de la β -oxidación y durante la noche se consume alrededor del 80 % del alimento total del día (Barger *et al.*, 2000). La reducción de la expresión de *PPAR α* se ha relacionado con un metabolismo de lípidos deficiente (Stec *et al.*, 2019). Dado que el tratamiento con la dieta alta en grasa ocasionó un incremento en el colesterol total y los triglicéridos, sin importar la hora del sacrificio, se sugiere que podría deberse a la disminución en la expresión de *PPAR α* que se observó en este grupo. La recuperación del ritmo y expresión de *PPAR α* se ha relacionado también con la suplementación con ácido ferúlico (Luo *et al.*, 2022), donde al suministrar una dosis de 4 mg al día se evitaron los efectos de la dieta alta en grasa sobre la expresión de este gen. Si bien en las dietas suplementadas con el ingrediente de cacao (estándar y alta en grasa) solamente presentan 0.18 mg de ácido ferúlico al día podría sugerirse la influencia de este compuesto en la recuperación de los niveles de *PPAR α* similares al grupo estándar, posiblemente en sinergia con algún otro compuesto de la dieta, ya que se ha demostrado que activa su expresión en animales sometidos a dietas altas en grasa (Luo *et al.*, 2022).

El hígado es un tejido seleccionado por la cronobiología para estudiarlo debido a que puede mantener un ritmo autónomo (de Assis *et al.*, 2021). A pesar de que el núcleo supraquiasmático en el hipotálamo pierda su ritmicidad, el hígado puede

mantenerla o recuperarla debido a los compuestos lipídicos y xenobióticos obtenidos a partir de la dieta (de Assis *et al.*, 2021; Koronowski *et al.*, 2019). Alrededor del 10 % de los transcritos de genes hepáticos y el 20 % de los metabolitos dependen de la ritmicidad de los genes de reloj hepáticos (de Assis *et al.*, 2021), destacando la relevancia de que la oscilación de genes *Per2* y *PPARα* sea recuperada por efecto del ingrediente a nivel metabólico. Estos cambios en la expresión de genes de reloj, y controlados por reloj, podrían modificar rutas del metabolismo lipídico, evitando el incremento de triglicéridos en sangre (**Cuadro 17**) como se observó durante la noche en los animales alimentados con dieta alta en grasa suplementada con ingrediente.

Aun cuando el mecanismo de reloj hepático se liga mayoritariamente con la regulación del metabolismo, este también puede relacionarse con la actividad locomotora y la conducta alimenticia de los animales. En un estudio realizado por Gutman *et al.*, (2012) encontraron que al suministrar de forma crónica activadores de *PPARα* se logra una sobreexpresión de este gen, que genera un periodo más corto en la actividad locomotora durante oscuridad constante. El reloj hepático sigue un ritmo autónomo que depende de los ciclos de luz y tiene la capacidad de regular directamente la actividad locomotora, se ha reportado que animales con el gen *Bmal1* silenciado en hígado tienen una reducción en su actividad locomotora total e incluso pueden verse desincronizados en presencia de ciclos de luz/oscuridad regulares (Koronowski *et al.*, 2019). Además, la falta de sincronización de la actividad locomotora puede darse por una falta de expresión de *Per2*, el cual está directamente relacionado con la actividad de *Bmal1* (Koronowski *et al.*, 2019). Es por esto que esta tendencia a recuperar la oscilación y los niveles de expresión de los genes de reloj en hígado en el grupo con dieta alta en grasa con ingrediente de cacao podrían ser los responsables de la sincronización de la actividad locomotora tanto en ciclos de luz/oscuridad como en oscuridad constante.

b) Modulación de genes en íleon

La **Figura 19** muestra la expresión relativa en íleon de dos genes de reloj, *Bmal1* (**Figura 19A**) y *Per2* (**Figura 19B**). La sección intestinal correspondiente al íleon fue seleccionada debido a que es el segmento en el intestino delgado donde se da la mayor absorción de compuestos fenólicos, específicamente catequinas (Ishii *et al.*, 2019). Este es el primer trabajo donde se reporta la expresión de genes de reloj en la sección de íleon: anteriormente se han realizado evaluaciones en yeyuno, duodeno (Stokes *et al.*, 2017), colon proximal (Hoogerwerf *et al.*, 2007) o la combinación de todas las secciones del intestino delgado (Yu *et al.*, 2019). Para las comparaciones se estarán utilizando como referencia las secciones más cercanas anatómicamente, o con mayor similitud en el tejido.

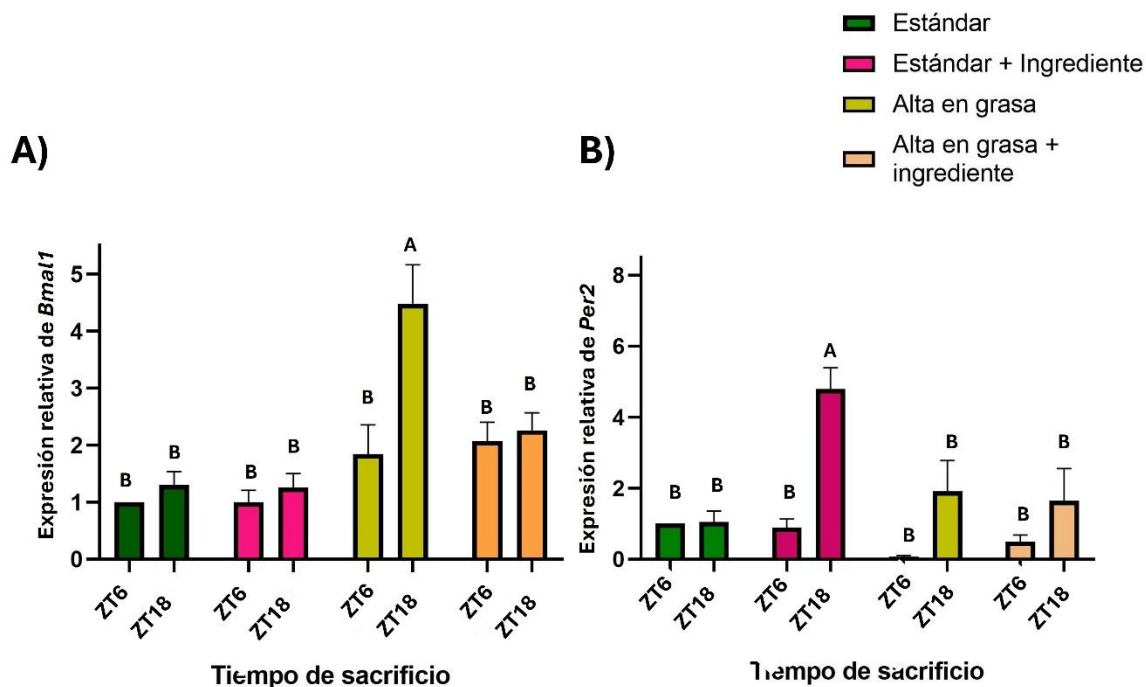


Figura 19. Expresión relativa de genes de reloj en íleon. **A)** Expresión relativa de *Bmal1*. **B)** Expresión relativa de *Per2*. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (n=6) y expresados en función del gen B2m, normalizando a uno la expresión del grupo con dieta estándar en el día. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempo de sacrificio. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

La expresión relativa de *Bmal1* (**Figura 19A**) en íleon para el grupo estándar no presentó oscilación, independiente de la hora de sacrificio ($p>0.05$), resultados similares obtenidos para el grupo con una dieta estándar suplementado con el ingrediente de cacao y para el grupo de la dieta alta en grasa suplementada con el ingrediente. Los animales alimentados con la dieta alta en grasa presentaron una oscilación significativa con mayor expresión de *Bmal1* durante la fase nocturna ($p<0.05$). Además, la dieta alta en grasa incrementó los niveles de expresión de *Bmal1*, con diferencia, respecto al resto de las dietas, en los valores de expresión en el ZT18. La suplementación con el ingrediente logró amortiguar los efectos de la dieta alta en grasa: se eliminó la oscilación de *Bmal1*, equiparando los valores de a una tendencia similar al grupo de la dieta estándar.

Se ha reportado que, para ratones de edad similar, tomando las secciones de yeyuno y duodeno el nivel máximo de expresión para *Bmal1* es en el ZT22, mientras que el mínimo es en el momento justo del apagado de luces ([Stokes et al., 2017](#)). En este experimento se tomaron muestras en los ZT6 y ZT18, por esto, aunque la oscilación del gen no se da de manera significativa, es posible apreciar un ligero incremento durante la fase nocturna. De acuerdo con [Yu et al. \(2019\)](#), la función de *Bmal1* en el intestino es regular directamente a los demás genes de la maquinaria del reloj; se ha encontrado que una sobreexpresión intestinal de *Bmal1* se puede generar en animales sometidos a dietas altas en grasa, como se observó en este trabajo (**Figura 19A**). Además, el incremento en la expresión intestinal de este gen puede llegar a relacionarse con un exceso en la absorción de grasas de la dieta y conducir a obesidad ([Yu et al., 2019](#)).

La recuperación de niveles de expresión de *Bmal1* en la dieta alta en grasa con el ingrediente a valores similares al grupo de dieta estándar ($p>0.05$) puede verse reflejado en el peso corporal de este grupo que, si bien no presentó diferencia significativa respecto al grupo con dieta alta en grasa, mostró tendencia a disminuirlo sin modificar la ingesta de alimento. Recuperar la fase de oscilación y los niveles de expresión en *Bmal1* a nivel intestinal se ha relacionado con mejora

en el manejo de la glucosa, reducción de la esteatosis hepática y disminución de los triglicéridos sanguíneos (Yu et al., 2021). La suplementación con el ingrediente de cacao redujo la glucosa sanguínea, solamente durante el día en el grupo con dieta alta en grasa, mientras que los triglicéridos disminuyeron durante la fase nocturna, posiblemente como resultado de la recuperación del ritmo y la expresión de *Bmal1*.

La expresión relativa de *Per2* se presenta en la **Figura 19B**, en dónde es posible apreciar que no existe una oscilación de este gen en el grupo de la dieta estándar, teniendo valores similares tanto en el ZT6 como en ZT18. La suplementación de la dieta estándar con el ingrediente ocasionó que la expresión de *Per2* resultara más alta de noche que de día ($p < 0.05$), indicando la modulación de este gen a nivel intestinal como resultado de la suplementación con el ingrediente. Con respecto a la dieta alta en grasa, es posible apreciar que tuvo una tendencia a erradicar la expresión de *Per2* en ZT6 e incrementarla durante ZT18, sin diferencia significativa. La suplementación con el ingrediente de cacao a la dieta alta en grasa ocasionó una tendencia a recuperar la expresión en ZT6 y a disminuirla para ZT18, sugiriendo un intento de comportamiento más similar a la dieta estándar, sin diferencia estadística.

Al medir la expresión de *Per2* en yeyuno de ratones C57bl/6 de cuatro meses de edad, Froy et al. (2007) encontraron que tiene su máximo en el ZT15 y su mínimo en ZT3, lo que indica que el ingrediente de cacao en una dieta estándar podría estar provocando un avance de fase en su expresión. La ritmicidad de *Per2* a nivel intestinal lleva a la regulación de la enzima acetilcolina transferasa, una enzima sintetizada en las neuronas, y la óxido nítrico sintetasa neuronal (Hoogerwerf et al., 2007). Hay evidencia que la falta de regularización en el metabolismo de óxido nítrico lleva a enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer, debido a que cuando es degradado hay sustancias tóxicas a nivel neuronal que son producidas en las cascadas metabólicas (Iova et al., 2023); así mismo, cambios en la acetilcolina, un neurotransmisor encontrado en el sistema nervioso central y periférico, pueden incrementar la aparición de estas enfermedades

neurodegenerativas (Gu *et al.*, 2021). La recuperación de los niveles de *Per2* en el grupo de dieta alta en grasa con ingrediente nos sugiere que podría estarse protegiendo de enfermedades neuronales asociadas a dietas altas en grasa.

Debido a que el tracto intestinal es clave en la absorción de nutrientes, el efecto de los compuestos presentes en los alimentos sobre la expresión de genes de reloj en intestino es relevante para trazar un mecanismo de acción del ingrediente de cacao. La eliminación de genes de reloj en modelos murinos ha demostrado la relevancia del reloj intestinal, ya que se pierde la actividad de los enterocitos y no permite la sincronización ocasionada por la comida (Pan *et al.*, 2009). La falta de expresión de *Bmal1* en el intestino, similar a lo obtenido para la dieta alta en grasa durante el día para el presente trabajo, lleva a deficiencias en la absorción de calcio en los huesos, ocasionado por una falta de regulación en los receptores dependientes de vitamina D (Hussain, 2014; Kawai *et al.*, 2019; Pácha *et al.*, 2013).

Al ser este el primer estudio de la expresión de genes de reloj en íleon, no existe evidencia precisa de cuales compuestos bioactivos pueden ser los responsables de las modificaciones en la expresión de genes de reloj. A pesar de esto, se conoce que algunos compuestos bioactivos como las procianidinas, los AGCC y las catequinas provenientes de té verde pueden incrementar la expresión de *Bmal1*, *Rev-erb* y *Per2* en intestino delgado (Velásquez-Jiménez *et al.*, 2024). La presencia de fibra, que su fermentación lleva a AGCC, en el ingrediente de cacao sugiere que para terminar de establecer un mecanismo de acción del ingrediente es necesaria la cuantificación de AGCC.

c) Modulación de genes en tejido adiposo epididimal

En la **Figura 20** se muestra la expresión relativa de *Per2* en tejido adiposo. Se realizaron las pruebas necesarias para medir la expresión de *Bmal1*, sin embargo, no resultó posible cuantificar sus niveles de expresión debido a que se encontraban por debajo del límite de detección. La expresión de *Per2* para la dieta estándar

presenta una tendencia a mayor expresión para el tiempo ZT6 que para ZT18, sin diferencia entre ellos; sin embargo, esta tendencia es inversa cuando se suplementa con el ingrediente de cacao. La dieta alta en grasa ejerce el mismo efecto que el ingrediente, pero con una disminución en la expresión de *Per2* comparado con la dieta estándar. Por su parte, la administración del ingrediente de cacao en la dieta alta en grasa llevó a la reducción, casi eliminación, de la expresión de *Per2* al medirse en ZT6 ($p<0.05$) y una tendencia a disminuirlo en ZT18 ($p>0.05$).

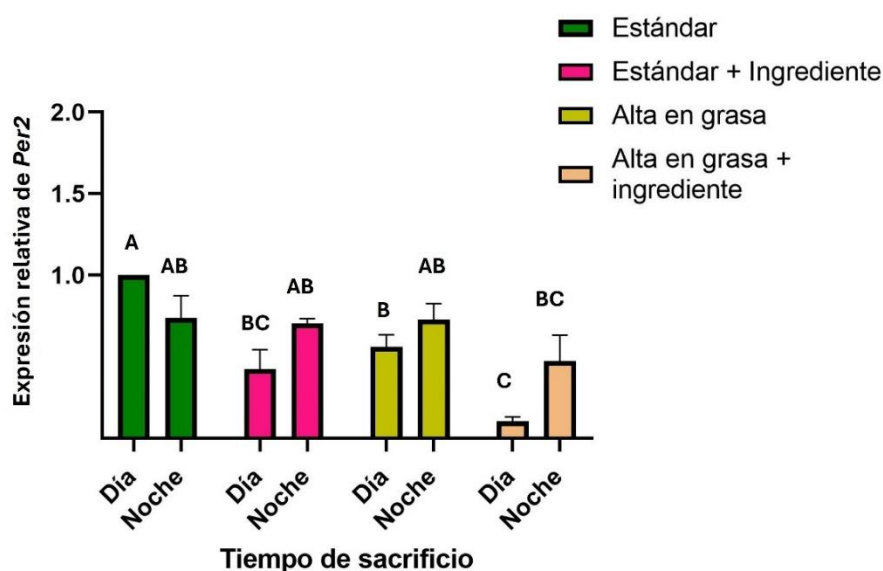


Figura 20. Expresión relativa de *Per2* en tejido adiposo epididimal.

Los resultados se expresan como media \pm error estándar ($n=6$) y expresados en función del gen B2m, normalizando a uno la expresión del grupo con dieta estándar en el día. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempo de sacrificio. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

El comportamiento para la dieta estándar es opuesto a lo reportado por [Kohsaka et al., \(2007\)](#), donde *Per2* incrementa su expresión en ZT18 respecto a ZT6. De manera similar, [van der Spek et al., \(2018\)](#) reportan que el máximo pico de expresión de *Per2* en tejido adiposo epididimal corresponde al ZT15, el cual se acerca a la

ventana de sacrificio utilizada por este trabajo. Al suministrar la dieta alta en grasa la falta de ritmo en la expresión de *Per2* es comparable con la literatura ([Kohsaka et al., 2007](#)), en dónde se reporta que su expresión permanece similar a lo largo del día, efecto similar al obtenido con el ingrediente de cacao en una dieta estándar. El ingrediente de cacao en la dieta estándar ejerció el mismo efecto de eliminar la ritmicidad en *Per2* a nivel hepático, lo que sugiere que el gen *Per2* es un blanco para los compuestos presentes en los subproductos de cacao. La dieta alta en grasa con ingrediente de cacao logró recuperar la ritmicidad de *Per2* de acuerdo con lo reportado para una dieta estándar en animales sanos, donde la expresión de noche representa cuatro veces la expresión durante el día ([Kohsaka et al., 2007](#); [Van der Spek et al., 2018](#)), misma proporción encontrada para este gen en el presente trabajo (**Figura 20**).

Para evaluar el efecto del reloj biológico en el tejido adiposo blanco se han utilizado modelos deficientes en genes de reloj. La falta de expresión de *Bmal1* y *Per2* en tejido adiposo lleva a un incremento de la adipogénesis ([Rosen et al., 2002](#); [Zvonic et al., 2006](#)). La expresión de genes relacionados con el metabolismo de lípidos es completamente eliminada cuando se administran dietas altas en grasa, pero solamente sucede en animales macho ya que las hembras son protegidas por los estrógenos ([Omotola et al., 2019](#); [Palmisano et al., 2017](#)). Al comparar los resultados de *Per2* en tejido adiposo se observa que la dieta alta en grasa tiende a disminuir los niveles de expresión, mientras que el ingrediente de cacao potencia este efecto; estos resultados podrían relacionarse con la acumulación de tejido adiposo gonadal y el incremento de peso durante las catorce semanas de ensayo. Esta evidencia resalta la relevancia de la ritmicidad en el tejido adiposo blanco para la regulación metabólica.

Los compuestos fenólicos presentes en el jugo de uva coinciden con el perfil fenólico de la cascarilla de cacao presente en el ingrediente, siendo relevante el contenido de catequinas. Se ha reportado que los compuestos fenólicos del jugo de uva pueden inducir el incremento de genes de reloj como *Clock*, *Per1*, *Cry1* y *Rev-*

erb por activación de la síntesis de leptina en el tejido adiposo (Velásquez-Jiménez et al., 2024). Estos compuestos presentes en el ingrediente podrían estar modulando a *Per2* en tejido adiposo a través de este mecanismo.

d) Modulación de genes en hipotálamo

En la **Figura 21** se muestra la expresión relativa de dos genes de reloj, *Bmal1* y *Per2*, en el hipotálamo. En el grupo con la dieta estándar se presentó una expresión de *Bmal1* (**Figura 21A**) con oscilación significativa ($p < 0.05$), teniendo mayores valores de expresión en ZT6 que en ZT18. El grupo de la dieta estándar con el ingrediente presentó una tendencia similar a la dieta estándar, con niveles menores de expresión para ambos tiempos de sacrificio, pero manteniendo la oscilación. La exposición por 14 semanas a la dieta alta en grasa generó que la oscilación de este gen se atenuara (sin diferencia por tiempo de sacrificio), esto debido a la tendencia a reducir la expresión durante el día. Por otro lado, la suplementación del ingrediente de cacao en una dieta alta en grasa logró recuperar la oscilación ($p < 0.05$) de *Bmal1*; si bien los niveles de expresión no alcanzan a equipararse al grupo estándar, si se mantiene una proporción donde el gen se expresa más en ZT6 que ($p < 0.05$).

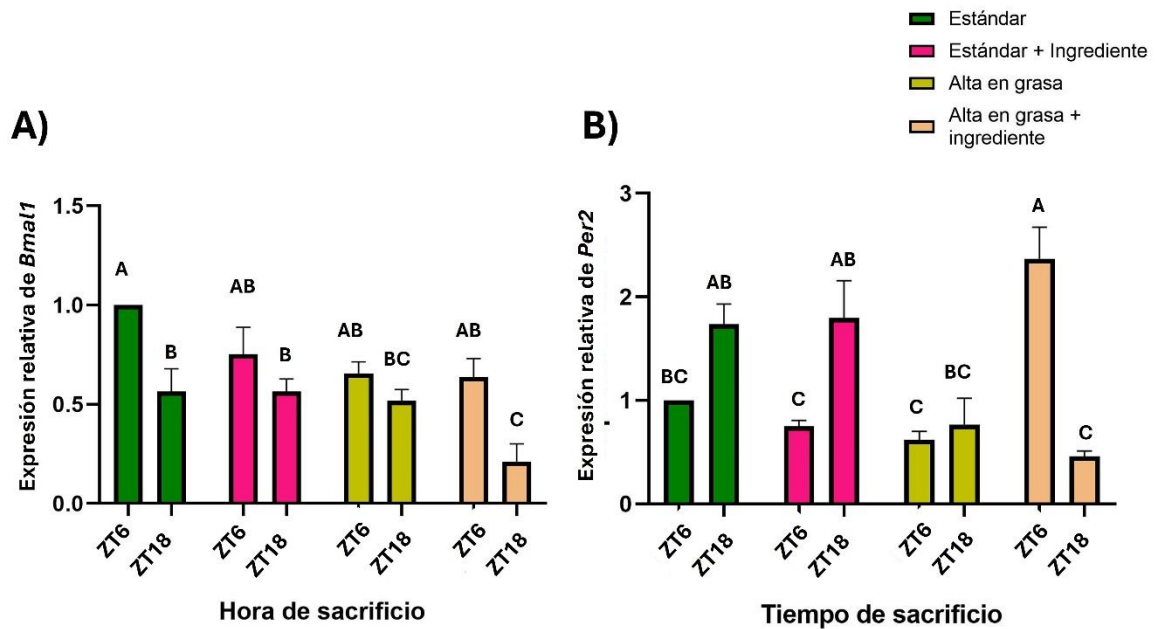


Figura 21. Expresión relativa de genes de reloj en hipotálamo.

A) Expresión relativa de *Bmal1*. **B)** Expresión relativa de *Per2*. Los resultados se expresan como media \pm error estándar (n=6) y expresados en función del gen *B2m*, normalizando a uno la expresión del grupo con dieta estándar en el día. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempo de sacrificio. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

En ratones C57bl/6, la expresión de *Bmal1* a nivel hipotalámico tiene su mayor punto de expresión en al ZT=6 (día), similar a lo obtenido en este trabajo para la dieta estándar, mientras que la mínima expresión se da al encendido de luces (Ribas-Latre *et al.*, 2015c). La administración de GSPE, recordando que comparte componentes bioactivos con el ingrediente de cacao, en una dieta estándar, crea un adelanto en la expresión de *Bmal1* en el hipotálamo con un máximo de expresión en ZT3 (Ribas-Latre *et al.*, 2015c). En este proyecto se encontró una disminución de la expresión de *Bmal1* durante el día para el grupo estándar con ingrediente, la cual podría deberse a los compuestos presentes en los subproductos de cacao.

Las dietas altas en grasa ejercen un efecto sobre la expresión hipotalámica de *Bmal1*, donde se elimina la oscilación, pero prácticamente sin modificar los niveles de expresión (Kohsaka *et al.*, 2007), similar a lo encontrado en el presente trabajo

(Figura 21A). La suplementación con los subproductos de cacao en la dieta alta en grasa generó una recuperación en la oscilación similar al grupo estándar, pero sin recuperar los niveles de expresión ($p < 0.05$). Anteriormente se ha reportado que bajos niveles de expresión en *Bmal1* en el cerebro se relacionan con bajos niveles de actividad locomotora (Brown *et al.*, 2019; Hagihara *et al.*, 2016). Esta recuperación en la oscilación de *Bmal1*, pero con bajos niveles de expresión podría explicar los resultados de actividad para el grupo alto en grasa suplementado con el ingrediente, donde a pesar de recuperar la longitud del periodo de actividad locomotora en oscuridad constante (Figura 15), los animales continuaban moviéndose menos, similar a una dieta alta en grasa.

La expresión de *Per2* para el grupo estándar a nivel hipotalámico resultó similar a lo reportado previamente (Kohsaka *et al.*, 2007), con una mayor expresión para ZT18 contra ZT6; este patrón permaneció aún con la suplementación del ingrediente en la dieta estándar, sugiriendo que no existe un efecto sobre la expresión de este gen ocasionada por el ingrediente en condiciones bajo una alimentación estándar. Por su parte, el grupo con la dieta alta en grasa presentó una pérdida en la oscilación de *Per2* y su expresión resultó disminuida con respecto al grupo de la dieta estándar. El ingrediente de cacao al suplementarse sobre la dieta alta en grasa invirtió la relación día/noche respecto a la dieta estándar ($p < 0.05$), teniendo valores incrementados para ZT6 que para ZT18. Estos resultados evidencian el efecto que el ingrediente tiene directa o indirectamente sobre el reloj hipotalámico. Los mecanismos correspondientes no son conocidos por lo que debe ser estudiado.

La suplementación con catequinas provenientes de GSPE (Ribas-Latre *et al.*, 2015c) generó un avance, de media hora, en la fase de *Per2* en cerebro; además modificó los niveles de expresión disminuyéndolos ligeramente durante el día e incrementándolos de noche, lo cual coincide con lo encontrado en el presente trabajo al suplementar la dieta estándar con el ingrediente de cacao. La arritmia ocasionada por la dieta alta en grasa en la expresión de *Per2*, así como la disminución en su expresión, se relaciona con la actividad locomotora presentada

en el objetivo 3 donde se encontró una reducción en los niveles de actividad y una arritmia total al momento de evaluar el periodo en libre curso. Los bajos niveles de la expresión de *Per2* en hipotálamo se relacionan con periodo circadiano de la actividad locomotora más largo en oscuridad constante y con menor cantidad de cruces a la jaula (Hagihara *et al.*, 2016). Los resultados del cambio de fase en el grupo de la dieta alta en grasa con ingrediente podrían deberse a que las catequinas tienen un efecto potenciado de avance de fase, similar a lo reportado por Ribas-Latre *et al.* (2015c) en una dieta estándar y lo encontrado en la expresión de *Per2* en hígado cuando se suplementó con el ingrediente de cacao. Respecto a la actividad locomotora el grupo con dieta alta en grasa suplementada con el ingrediente presentó patrones de actividad similares tanto a la dieta estándar como a la dieta alta en grasa, reducción en los cruces de jaula, pero un periodo en oscuridad constante corto. Lo anterior sugiere que este cambio de fase en *Per2* podría ser responsable de que no se logre recuperar los patrones de actividad equiparables a un animal sano, pero evitando los patrones típicos de un animal desincronizado por exceso de grasas en su dieta.

Si bien en este trabajo la expresión de genes de reloj en hipotálamo está relacionada con el efecto directo de la dieta sobre el núcleo supraquiasmático, es necesario hacer énfasis que al extraer todo el hipotálamo también se está midiendo el efecto en los demás núcleos hipotalámicos, por lo que la influencia de estos en los resultados presentados no puede ser diferenciada en este trabajo. El hipotálamo juega un papel clave para la ingesta energética, el metabolismo y los ciclos de sueño (Van Drunen *et al.*, 2021) y la regulación depende del núcleo hipotalámico en cuestión. El núcleo arqueado se relaciona directamente con el consumo de alimento (Van Drunen *et al.*, 2021) y además presenta su propia oscilación de genes de reloj a lo largo del día (Abe *et al.*, 2002; Cedernaes *et al.*, 2019). Las neuronas que conforman al núcleo arqueado son las neuronas *Kiss1*, estas modulan con los ritmos de alimentación, ciclos de sueño-vigilia y la temperatura corporal; este tipo de neuronas siguen un ritmo independiente al núcleo supraquiasmático (Padilla *et al.*, 2019). La regulación de los genes de reloj en el núcleo paraventricular está

relacionada con la expresión rítmica de los receptores de ácido-γ-aminobutírico (GABA) ya que depende directamente de la ritmicidad de BMAL1 (Mazier *et al.*, 2019). De forma que la ritmicidad de cada sección del hipotálamo está relacionada con efectos sobre el metabolismo a lo largo del día.

e) Integración del efecto cronobiótico del ingrediente de subproductos de cacao sobre la desincronización inducida por dieta alta en grasa en un modelo murino

La **Figura 22** presenta la integración de los resultados de expresión de genes de reloj obtenidos para los grupos de dieta alta en grasa y la dieta alta en grasa con ingrediente en los cuatro tejidos evaluados. Se seleccionaron estos dos grupos para ver el efecto de un tratamiento directo (suplementación con el ingrediente) sobre un estado desincronizado por una dieta alta en grasa. Los resultados son comparados con el grupo de dieta estándar en la expresión durante el día (ZT6).

En el hígado, la dieta alta en grasa generó un cambio de fase en la oscilación de *Bmal1*, la cual se mantuvo aún en el grupo suplementado con el ingrediente de cacao. La dieta alta en grasa eliminó la oscilación de *Per2* y *PPARα*, mientras que el ingrediente de cacao en un 6 % de suplementación recuperó la oscilación de ambos genes.

El presente trabajo es la primera evidencia de la expresión de genes de reloj en íleon de un modelo murino desincronizado, encontrando que la dieta alta en grasa lleva a un cambio de fase en *Bmal1*, cambio que se previene por la suplementación con el ingrediente; mientras que el efecto de cambio de fase en *Per2* se presentó también en la dieta suplementada con el ingrediente.

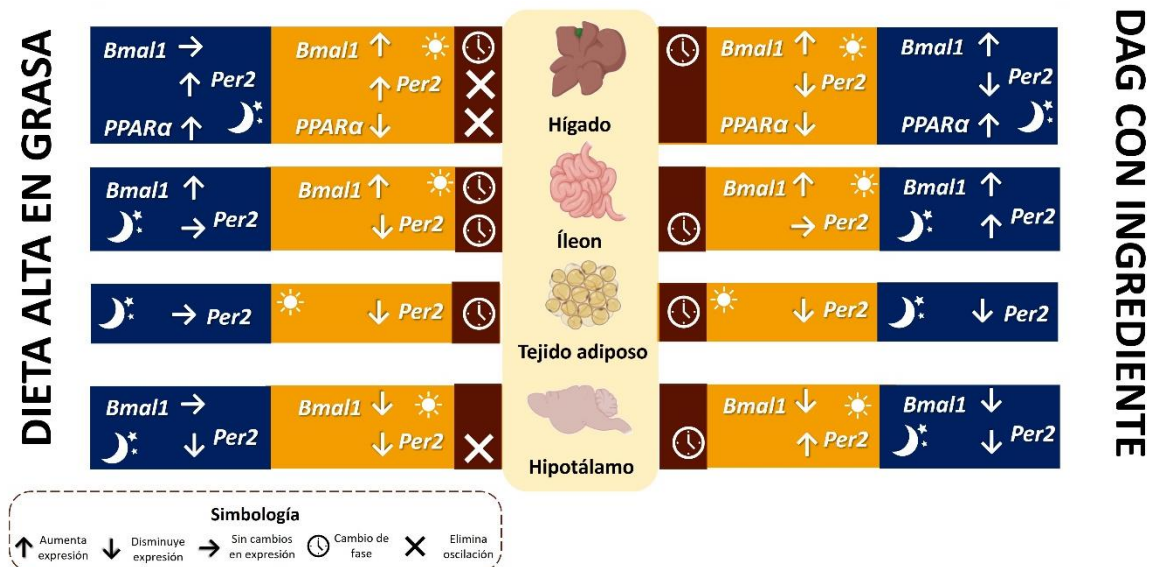


Figura 22. Efecto del ingrediente de subproductos de cacao sobre los genes de reloj y modulados por reloj en diferentes tejidos, comparando las dietas altas en grasa.

El color café indica el efecto en general sumando día y noche. Sección amarilla indica los efectos en la fase de día (ZT6), mientras que la sección azul los efectos durante la noche (ZT18). Simbología abajo a la derecha: ↑Aumenta la expresión, ↓ Disminuye la expresión, → Sin cambios en la expresión, ⌚ cambio de fase, ✕ elimina oscilación. DAG: Dieta alta en grasa.

En tejido adiposo, tanto la dieta alta en grasa como la dieta alta en grasa suplementada con el ingrediente generaron un cambio de fase en *Per2*; sin embargo, en el caso del grupo suplementado con el ingrediente este cambio de fase recuperó una oscilación similar a la reportada en la literatura para una expresión más parecida a un ratón sano. En hipotálamo, la dieta alta en grasa eliminó la oscilación de *Bmal1* y *Per2*, mientras que el ingrediente de subproductos de cacao lo evitó en ambos casos, pero para *Per2* generó un cambio de fase.

Los modelos mutantes, donde se elimina la expresión de un gen para evaluar los cambios en las demás rutas de señalización, son ampliamente utilizados para ver efectos sobre los genes de reloj. Ratones con silenciamiento en la expresión de *Clock* y *Per2* se ha relacionado con ritmos circadianos anormales, incremento de alimentación durante la fase de reposo y mayor susceptibilidad a desarrollar

obesidad (Turek *et al.*, 2005). En el presente trabajo los animales alimentados por la dieta alta en grasa presentaron la reducción de la oscilación de *Per2* y de sus niveles de expresión tanto en hígado como en cerebro, lo cual podría relacionarse con la ganancia de peso y las alteraciones en sus patrones de actividad locomotora. De manera opuesta, la sobreexpresión de este gen en hígado de animales bajo la dieta estándar suplementada con subproductos de cacao podría ser la responsable del mejor descanso de los animales durante la fase de reposo.

En los cuatro tejidos evaluados en este proyecto, la expresión de *Per2* resultó alterada por la dieta alta en grasa, siendo uno de los genes más modulados por los compuestos presentes en los alimentos. En un estudio realizado por Carvas *et al.* (2012) se encontró que el silenciamiento del RNA mensajero de *Per2* compromete la activación de los receptores de insulina; estas alteraciones se dan tanto en hígado como en tejido adiposo y suceden vía Akt. Ratones con mutaciones en el gen *Per2* han demostrado tener hiperinsulinemia e hipoglucemia, debido a disminución en la actividad de la glucógeno sintetasa (Carvas *et al.*, 2012). Estos efectos adversos se dan por un exceso en la producción de óxido nítrico, lo cual se ha relacionado con problemas cardiovasculares propios del desarrollo de obesidad (Bornfeldt *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011).

El tejido endotelial, similar al que sostiene la estructura intestinal, de ratones que no expresan *Per2*, ha sido asociado con modificaciones en el desarrollo del tejido, mostrando senescencia anticipada, falta de conexión entre células y una tendencia a menor proliferación (Wang *et al.*, 2008). En el estudio de Carvas *et al.*, (2012) las modificaciones en *Per2*, aún con animales alimentados con dieta alta en grasa demostraron no afectar los patrones de crecimiento, mantuvieron la misma composición corporal y los hábitos de alimentación. Similar a lo que se encontró en el presente estudio: se logró recuperar la expresión de *Per2* en la dieta alta en grasa con el ingrediente, pero no existieron cambios en los patrones de alimentación ni de crecimiento.

En el tejido adiposo, la falta de expresión de *Per2* se relaciona con alteraciones en el metabolismo lipídico. La proteína PER2 es la única proteína del reloj que interactúa directamente con PPAR γ , tanto con la isoforma 1 como con la 2; esto se debe a que PER2 tiene un dominio involucrado en la represión de PPAR γ (Grimaldi *et al.*, 2010). De acuerdo con Grimaldi *et al.* (2010), el 34 % de los genes regulados por la expresión de *Per2* en tejido adiposo blanco corresponden al metabolismo de lípidos, siendo el principal objetivo PPAR γ ; el 14 % de los genes del metabolismo de carbohidratos son modulados por *Per2*, mientras que del metabolismo de proteínas y aminoácidos corresponden al 7 %. En animales donde se reducen los niveles de expresión de *Per2* se ha encontrado elevación en ácidos grasos libres del tejido adiposo blanco, especialmente ácidos grasos saturados, monoinsaturados y de cadenas muy largas. Los estudios de Carvas *et al.* (2012) y Grimaldi *et al.* (2010) sugieren estudiar más a fondo cómo la regulación de *Per2* ejerce un efecto sobre las rutas metabólicas de lípidos y la señalización de rutas de insulina, ya que esto se desconoce hasta el momento, siendo un área de oportunidad para este trabajo.

Los efectos de la alteración en la expresión de *Bmal1* también han sido evaluados. Ratones sin expresión de *Bmal1* presentan actividad total reducida en ciclos de luz/oscuridad y arritmia completa en oscuridad constante (Bunger *et al.*, 2000; Guan *et al.*, 2021). En el presente trabajo existieron animales pertenecientes al grupo alto en grasa que presentaban arritmia circadiana; la dieta alta en grasa generó un cambio de fase de *Bmal1*, a la vez que redujo los niveles de expresión, sugiriendo ser en parte responsable de los cambios en la actividad locomotora. Además, ratones mutantes con eliminación de *Bmal1* se han relacionado también con problemas en la gluconeogénesis, desarrollo de envejecimiento prematuro, reducción en la esperanza de vida e incremento en la ganancia de peso (Rudic *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). La inhibición de *Bmal1* en hígado genera un incremento en los triglicéridos y colesterol, tanto séricos como hepáticos (Jacobi *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2016); en el tejido adiposo, inhibir a *Bmal1* lleva a incremento de la grasa visceral y ganancia de peso debido a una disminución en el gasto

energético y un incremento en la ingesta alimenticia (Paschos *et al.*, 2012). Esto demuestra la especificidad de *Bmal1* para regular diversas vías metabólicas dependiendo del tejido evaluado.

La obesidad desarrollada en los animales en los grupos de dieta alta en grasa (con o sin ingrediente) se podría relacionar no solo con los cambios en la expresión de genes de reloj. Un patrón alimenticio en el que los animales consumen más alimento durante la fase de reposo se ha relacionado con expresión arrítmica de *Bmal1*, *Per2* y *Npas2*, lo cual lleva a eliminación del ritmo de la proopiomelanoicortina (POMC), una hormona relacionada con la regulación del apetito y la conducta alimenticia (Sutton *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que la obesidad genera la producción de radicales libres, que pueden alterar el estado redox de las células (Diano *et al.*, 2011; Dietrich *et al.*, 2010; ZB, 2008). Las proteínas CLOCK, NPAS2, BMAL1 y PER2 contienen un dominio sensible a alteraciones en el estado redox, indicando que podían verse alteradas por el estado oxidativo generado por la obesidad (McIntosh *et al.*, 2010).

Las dietas altas en grasa se han relacionado con la inducción de un estado de inflamación constante y puede deberse a diversas rutas. La deficiencia en la expresión de *Per2* en los animales alimentados con dietas altas en grasa lleva a irregularidades en la secreción de glucocorticoides; esto genera un exceso en la oxidación del tejido adiposo blanco, ocasionada por una acumulación excesiva de triglicéridos (Arble *et al.*, 2009; Roenneberg *et al.*, 2012). Se ha reportado que la presencia de grasa saturadas en la dieta occidental, similar a la utilizada en el presente trabajo, incluyendo al ácido palmítico, lleva a la desincronización de *Bmal1*- lo que coincide con los resultados observados en los órganos evaluados-, y *Nampt*, que lleva a deficiencias en la vía del NAD⁺, terminando en neuroinflamación (Morrison *et al.*, 2014). La neuroinflamación se ha relacionado con la progresión del Alzheimer, debido a que la disrupción en la expresión de BMAL1 se ha relacionado con incrementar la inflamación en la placa β -amiloide (Baloyannis *et al.*, 2015). Un estudio clínico reportó que modificaciones en los ritmos de expresión de *Bmal1*,

similar a lo encontrado en todos los tejidos evaluados en el grupo de la dieta alta en grasa, se ha asociado con la aparición temprana de Alzheimer ([Van Drunen et al., 2021](#)). La evaluación de factores de inflamación, o de estrés oxidativo podría ser un área de oportunidad para comprobar el efecto neuroprotector del ingrediente de cacao sobre las patologías relacionadas con la administración de una dieta alta en grasa.

Debido a lo reciente que es el área de la crononutrición, pocos estudios con moléculas bioactivas han sido dirigidos para evaluar su efecto sobre los genes de reloj, tal es el caso de la nobiletina, un flavonoide presente en las cáscaras de cítricos. La nobiletina presentó un efecto activador de la transcripción de ROR, un gen de la tercera asa del reloj molecular, lo cual podría evitar el desarrollo de hígado graso no alcohólico y la expansión del tejido adiposo epididimal, así como evitar síntomas relacionados con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, todo esto modulado por *Bmal1* ([Nakamura et al., 2011](#); [Petrenko et al., 2020](#); [Rakshit et al., 2020](#)). El ingrediente de cacao diseñado contiene flavonoides como catequina, epicatequina y algunos ácidos fenólicos, lo que sugiere que estos compuestos podrían ser los responsables de modular la expresión de genes de reloj. Debido a que el ingrediente de subproductos de cacao diseñado es una matriz compleja, existen otros elementos que podrían estar ejerciendo un efecto sobre el ciclo circadiano.

De acuerdo con [de Assis et al. \(2021\)](#), el núcleo supraquiasmático envía cuatro tipos de señales que sincronizan las vías metabólicas. La primera ruta de señalización abarca a la expresión de los genes de reloj, la oscilación de sus niveles durante el día y su ritmicidad. La segunda ruta es hormonal, que se genera en el eje pituitaria-adrenocortical, vía glucocorticoides. Una tercera ruta es a través de la conducta alimenticia, debido a que la alimentación es un *Zeitgeber* relevante para señalizaciones metabólicas. Por último, el cuarto recurso es mediante los ritmos de temperatura interna. A pesar de que el cerebro es el órgano que sincroniza a los

demás, esto no significa que sea inmune a señales internas: los relojes periféricos pueden generar una adaptación del sistema del reloj central (de Assis *et al.*, 2021).

Para que los ritmos metabólicos puedan mantenerse, la señalización hipotálamo-periféricos debe permanecer (Bechtold *et al.*, 2013). Las dietas altas en grasa causan que estas señalizaciones pierdan su conexión y sean restauradas de manera poco eficiente, debido a la pérdida de ritmos metabólicos, siendo los más afectados los metabolitos en plasma (Dyar *et al.*, 2018). Dos ejemplos de rutas metabólicas que dependen de la sincronización entre relojes son excreción de insulina por el páncreas y el metabolismo lipídico en el tejido adiposo; estos se han relacionado directamente con los niveles de expresión y la permanencia de la oscilación de *Per2* tanto en tejidos periféricos como en el sistema nervioso central (Bechtold *et al.*, 2013). Los compuestos presentes en el ingrediente de subproductos de cacao podrían estar recuperando la sincronización de estas vías de señalización ayudando a evitar la desincronización dada por una dieta alta en grasa. De forma que evaluar la concentración de metabolitos de compuestos presentes en el ingrediente de cacao en plasma y en diferentes tejidos resultaría en una manera de proporcionar información de los compuestos posiblemente responsables en recuperar estas señalizaciones alteradas por la dieta alta en grasa.

3. Análisis del metabolismo en los tejidos colectados del modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa

Con el fin de determinar el destino fisiológico de los compuestos bioactivos provenientes del ingrediente de cacao, se realizó un análisis metabolómico en plasma, hígado y cerebro. Como se mencionó en la sección de metodología, se realizaron QCs para determinar la calidad de los datos obtenidos. En la **Figura 23** se muestran los análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) para las tres muestras biológicas analizadas: los QC's aparecen en el centro y agrupados, esto nos indica que las extracciones, procesamiento y análisis de datos se realizaron de manera correcta (Klavus *et al.*, 2020).

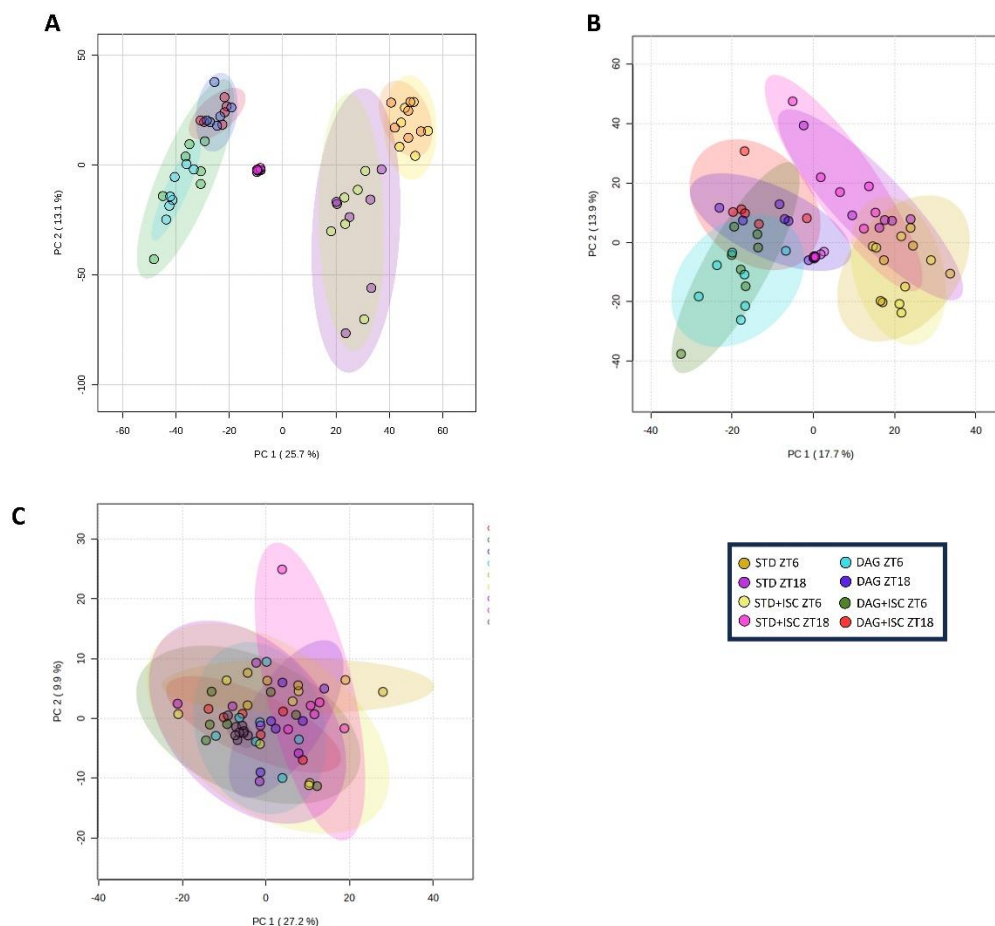


Figura 23. Análisis de componentes principales (PCAs) de los diferentes tejidos analizados.

A) Plasma, B) Hígado y C) cerebro con controles de calidad. STD: Dieta estándar. HFD: Dieta alta en grasa. QC: Controles de calidad. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao.

a) *Metabolismo endógeno de plasma*

Las muestras de plasma del modelo murino desincronizado alcanzaron un total de 2867 compuestos de interés biológico y de relevancia estadística ($p < 0.05$). La **Figura 24** muestra los PCAs de la variabilidad de los compuestos presentes en el plasma, representando a cada unidad experimental como un punto.

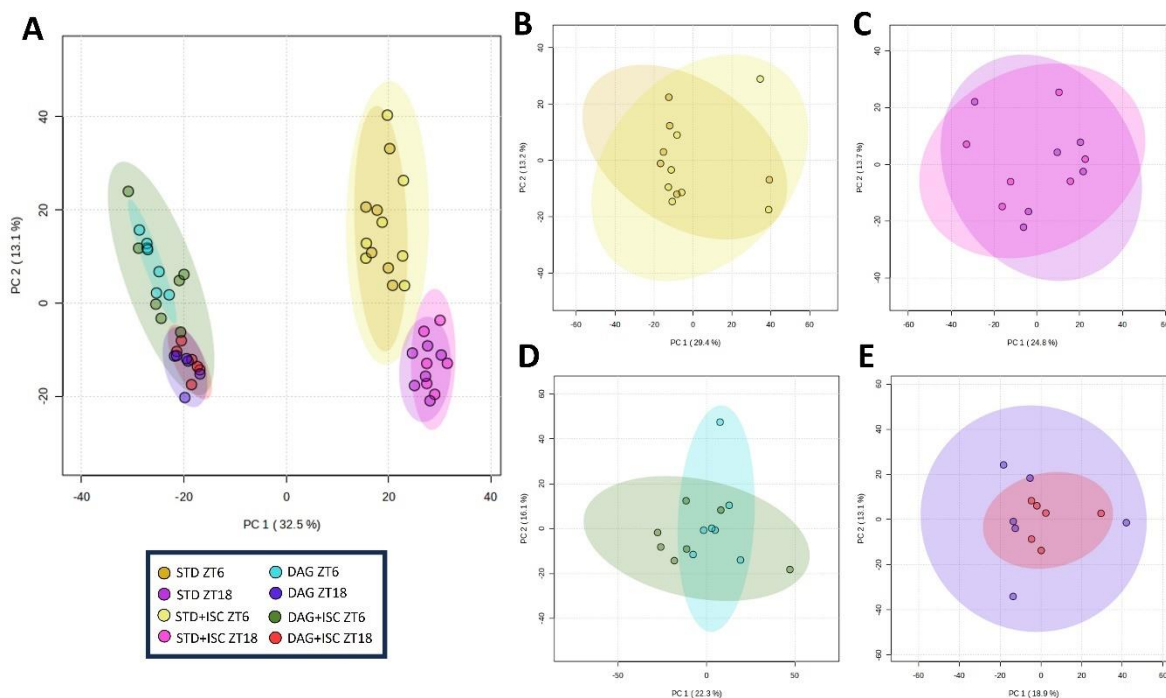


Figura 24. Análisis de componentes principales en el metaboloma de plasma.

A) Comparación entre todos los subgrupos. B) Comparación entre grupo estándar vs estándar con ingrediente al mediodía. C) Comparación grupo estándar vs estándar con ingrediente a medianoche. D) Comparación grupo alto en grasa vs alto en grasa con ingrediente al mediodía. E) Comparación grupo alto en grasa vs alto en grasa con ingrediente a medianoche. STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

El análisis de la variabilidad comparando todos los grupos se presenta en la **Figura 24A**. En la gráfica de componentes en 2D se aprecia que el primer componente (eje x) explica el 32.5 % de la variabilidad de los datos, mientras que el segundo (eje y) corresponde al 13.1 %, sumando el 45 % de la variabilidad; lo cual es común en los estudios de metabolómica no dirigida donde los primeros dos componentes representan entre el 30 y 50 % de la variabilidad total debido a su complejidad (Xia y Wishart, 2016). Respecto al primer componente es posible observar una clara separación entre los grupos de los animales alimentados con la dieta estándar (lado derecho) al compararlos con aquellos de los grupos con dieta alta en grasa (lado izquierdo). Esto es posible interpretarlo como que la composición de la dieta tiene un efecto predominante sobre el perfil metabólico del plasma.

El segundo componente (**Figura 24A**) muestra la diferencia en los compuestos presentes durante el muestreo de día comparándolo con el de noche, este efecto se observa mejor en los grupos alimentados con dieta estándar. Los grupos alimentados con dieta estándar (con o sin ingrediente de cacao) se encuentran a la derecha y se observa una separación ocasionada por la hora de sacrificio, en la cual sus elipses no se solapan. En el caso de los alimentados por la dieta alta en grasa a pesar de tener una diferencia debido a la hora de sacrificio, el intervalo de 95 % de confianza hace que las elipses se solapen. Esto podría explicar por qué algunos parámetros de la química sanguínea no presentaron diferencias entre día y noche en la dieta alta en grasa, mientras que en las dietas estándar si, como el caso del colesterol No-HDL y los triglicéridos (**Cuadro 17**). De manera que el tiempo de sacrificio también tiene un efecto sobre los compuestos presentes en sangre, sin embargo, este efecto es menor que el ocasionado por la composición de la dieta.

En la **Figura 24A** aparentemente no existe una separación de los individuos experimentales ocasionada por la suplementación con el ingrediente de cacao, para evitar el enmascaramiento que pudiera ocasionarse por el efecto de la dieta y hora del día se realizaron PCAs con cada pareja de subgrupos (**Figura 24B-E**) buscando comparar solamente el efecto del ingrediente. En el caso de la comparación entre dietas estándar (**Fig 24B** para STD ZT6 vs STD+ING ZT6, **24C** para STD ZT18 vs STD+ING ZT18), se observa que los puntos resultan muy cercanos entre sí, indicando que la suplementación con el ingrediente no explica la variabilidad de los componentes. A pesar de que en los grupos altos en grasa (**Figura 24D** para DAG ZT6 vs DAG+ING ZT6, **24E** para DAG ZT18 vs DAG+ING ZT18) se observa un comportamiento similar a los estándares, es necesario resaltar que en la comparación en el ZT18 (noche) (**Figura 24E**) se aprecia que los puntos de los ejemplares suplementados con el ingrediente de cacao están más conglomerados que aquellos sin suplementación. De forma que el efecto de la suplementación con el ingrediente de cacao no es suficiente para revertir los cambios ocasionados por la dieta alta en grasa.

Una vez realizado el análisis de componentes principales, se llevó a cabo un análisis de varianza considerando como único factor a cada subgrupo (ANOVA de una vía, $p < 0.05$). El análisis estadístico marcó que un total de 1243 compuestos varían significativamente debido a la dieta suministrada y la hora del día en que se llevó a cabo el sacrificio. En la **Figura 25** se presenta un *Heatmap* con los 1243 compuestos que resultaron significativos estadísticamente con el fin de observar su variabilidad de acuerdo con la dieta y el tiempo de sacrificio.

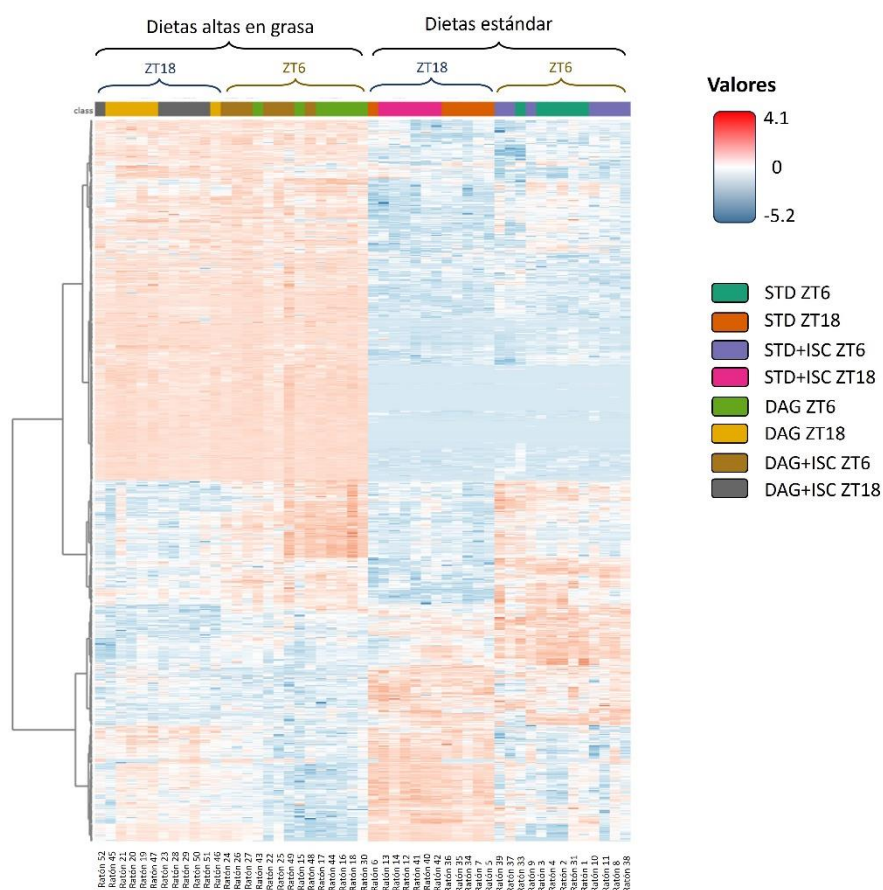


Figura 25. Heatmap de las correlaciones de los 1243 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en plasma.

STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

El *Heatmap* de la **Figura 25** se compone de la siguiente manera: a lo ancho está cada replica biológica mientras que los renglones conforman a cada uno de los 1243 compuestos de relevancia significativa. Se observa que existe una división debida a la composición de la dieta (Estándar o alta en grasa), donde incluso un segmento del gráfico se ve separado por un clúster formado de azul o rojo; esto refuerza lo observado en el PCA anterior, el mayor factor para la variabilidad en la composición del plasma fue la adición, o no, de grasa en la dieta. En la primera sección del gráfico se aprecian los clústeres formados por el software utilizado (Metaboanalyst) donde se ve que existen dos clústeres principales correspondientes a la dieta estándar y la dieta alta en grasa, sin darle importancia a la hora de sacrificio o la adición del ingrediente. Posteriormente, la hora de sacrificio logra hacer un agrupamiento, pudiendo así observar cuatro divisiones; sin embargo, en esta figura se aprecia que los individuos experimentales no logran separarse según si la dieta contenía o no suplementación con el ingrediente. Este efecto se puede observar en la sección superior donde los colores correspondientes a cada grupo se ven mezclados en parejas, ejemplo los animales con dieta estándar sacrificados de día, con o sin ingrediente. Estos clústeres nos permiten reafirmar lo observado en el PCA donde ya se sugería que la suplementación con el ingrediente tiene un efecto menor al ejercido por la grasa o la hora de sacrificio.

Con el fin de poder apreciar un efecto global en cada subgrupo experimental, se elaboró un *Heatmap* utilizando los promedios de proporción en cada subgrupo, se muestra en la **Figura 14**. En la parte superior en columnas se muestran los ocho subgrupos experimentales y hacia abajo se muestran los 1243 compuestos significativos en plasma; con cuadros y señalados con número se encuentran los clústeres (8) de compuestos con un patrón relevante para el proyecto; a la derecha de cada clúster se marca una escala para ubicar el número de compuestos presentes en cada uno de ellos.

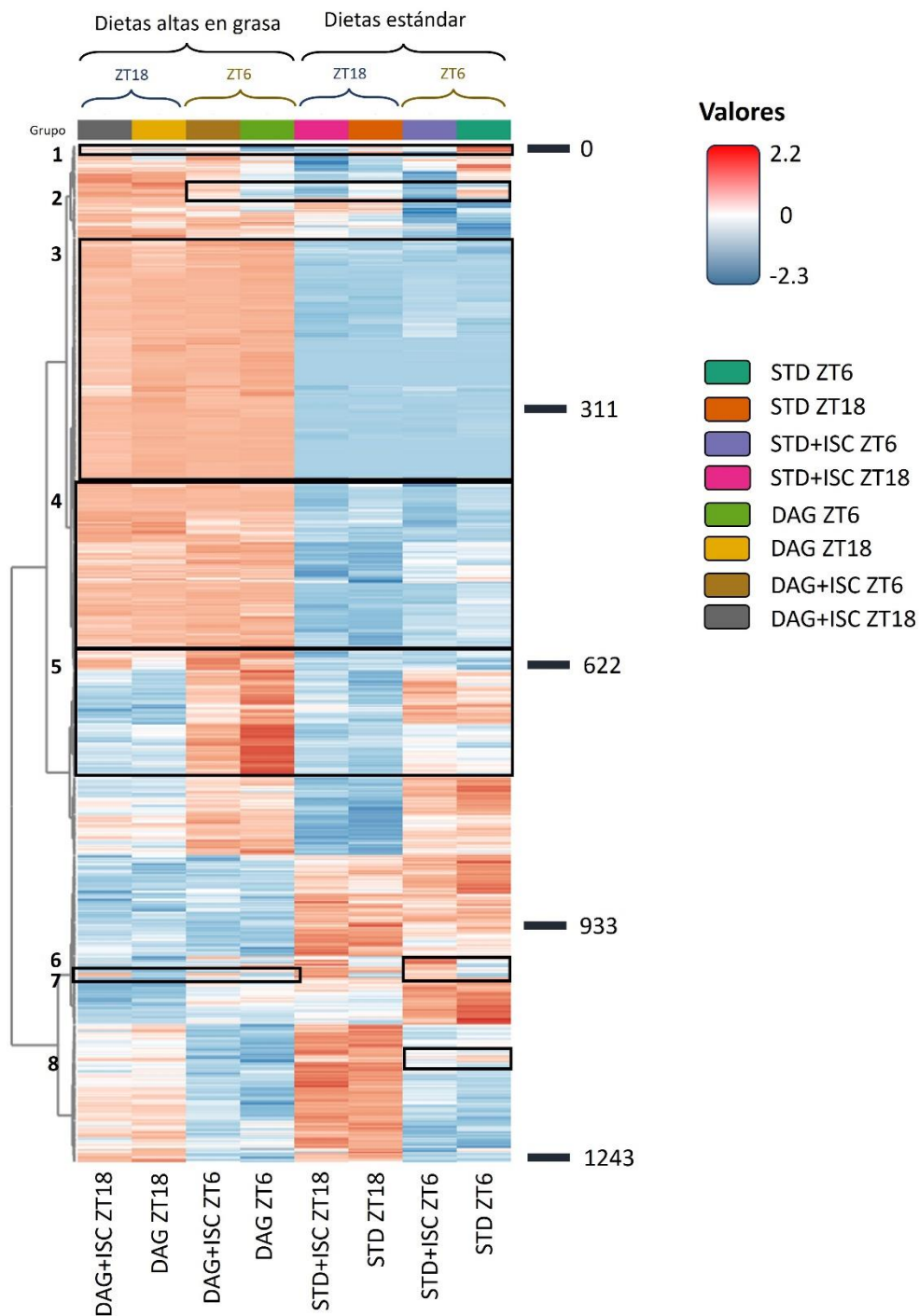


Figura 26. Heatmap de los promedios por subgrupo, comparando los 1243 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en plasma. STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

En la parte superior de la **Figura 26** se muestran los clústeres correspondientes al efecto de cada tratamiento experimental: dos divisiones grandes que hacen referencia a la separación del efecto por dieta estándar o dieta alta en grasa, posteriormente cada una de estas divisiones se secciona en dos grupos, indicando la segmentación por tiempo de sacrificio (mediodía o medianoche). Este comportamiento refuerza la variabilidad debido a la composición de la dieta y tiempo de sacrificio.

En la **Figura 26** el *clúster 3* corresponde a un total de 299 compuestos que demuestran una dependencia en su concentración con base a la adición de grasa en la dieta, siendo más altos para los tratamientos con dieta alta en grasa y disminuidos para las dietas estándar, sin depender del tiempo de sacrificio; de forma similar, el *clúster 4* se compone de 211 compuestos que, aunque su mayor efecto es ocasionado por el contenido de grasa en la dieta es posible observar ligeras variaciones que corresponden a la hora de sacrificio.

En el *clúster 5* de la **Figura 26** se observan 155 compuestos, los cuales son principalmente marcados por el efecto de la hora de sacrificio: mediodía o medianoche. Este bloque de compuestos se expresa mayormente durante el día, y disminuyen por la noche. A pesar de que parecen responder a la hora del sacrificio como factor determinante, también la composición de la dieta tiene un efecto, viéndose incrementada su concentración en la dieta alta en grasa durante el día. El efecto anterior se vio reducido por la suplementación con el ingrediente de cacao (Grupo HFD+ISC a mediodía), sugiriendo que el ingrediente podría estar previniendo en cierta medida las consecuencias de la dieta alta en grasa en cuestión de algunos metabolitos circundantes, los cuales se presentan en el Cuadro **18**.

Los clústeres 1, 2, 6, 7 y 8 (**Figura 26**) presentan 12, 18, 21, 9 y 10 compuestos respectivamente, los cuales se ven principalmente modulados por la presencia del ingrediente de cacao en la dieta, con diferentes efectos según la hora de sacrificio. En el clúster 1 se observa que el efecto del ingrediente de cacao sobre los 12

metabolitos depende de la composición de la dieta: en la dieta estándar estos compuestos se ven disminuidos al suplementar con el ingrediente de cacao, mientras que, en aquellos animales alimentados con la dieta alta en grasa aumentaron su concentración. Algo similar sucedió en el clúster 2, donde la inclusión del ingrediente en la dieta estándar disminuye la concentración en plasma de estos compuestos, mientras que la dieta alta en grasa los aumenta; sin embargo, este efecto solamente sucede cuando los animales son sacrificados al mediodía. Los clústeres 6 y 7 muestran que los compuestos son incrementados por la suplementación del ingrediente tanto para la dieta estándar como la dieta alta en grasa, pudiendo ser referente a algún compuesto intrínseco del cacao.

Como se mencionó, los compuestos presentes en plasma con diferencias significativas entre subgrupos fueron un total de 1243, de los cuales el efecto mayoritario provino de la inclusión de la grasa en la dieta, seguido de la hora del sacrificio. Si bien el ingrediente de cacao parece ser el tercer factor en cuestión de la variabilidad de las muestras, su efecto resulta relevante para este proyecto por lo que se seleccionaron aquellos compuestos que en la prueba pos-hoc mostraron diferencias ($p > 0.05$) entre mismos factores (dieta estándar o alta en grasa; sacrificio mediodía o medianoche) solamente considerando el efecto de la suplementación con el ingrediente. Bajo este contexto, 83 metabolitos presentan diferencias significativas como resultado de la suplementación con el cacao. Los metabolitos identificados se presentan en el Cuadro 18.

Las predicciones para los metabolitos encontrados en plasma (**Cuadro 18**) se pueden dividir en 13 categorías: carbohidratos, ácidos grasos de cadena media, larga, muy larga y ramificada, monoglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos, terpenoides, derivados de sales biliares, de compuestos fenólicos y de metilxantinas. En el Cuadro se presentan la predicción correspondiente, la masa del ión identificado (m/z), el aducto formado, el tiempo de retención (TR) y las comparaciones correspondientes. Las flechas hacia arriba indican que el compuesto se vio incrementado por la inclusión del ingrediente, hacia abajo que disminuyó y las

flechas dobles indican la aparición o desaparición del compuesto por efecto del cacao.

Cuadro 18. Cambios en la abundancia relativa de metabolitos plasmáticos analizados mediante UPLC-MS.

Predicción	m/z	Aducto	TR	STD vs STD- ISC ZT6	STD vs STD- ISC ZT18	DAG vs DAG- ISC ZT6	DAG vs DAG- ISC ZT18
<i>Carbohidratos</i>							
Ácido Gluconico	195.0505	M+H	2.2438	↓	↓	↔	↔
Fructoselisina-6-fosfato	387.1156	M+H	12.7634	↓	↔	↔	↔
D-Galactosa	179.0545	M+H	4.1993	↔	↑	↔	↔
<i>Ácidos grasos de cadena media</i>							
Ácido 3-hidroxidodecandioico	245.1382	M+H	14.4147	↑↑	↑↑	↔	↔
<i>Ácidos grasos de cadena larga</i>							
Ácido lesquerolico (isomero A)	325.2708	M+H	20.1414	↓↓	↔	↔	↔
17-fenil-18,19,20-trinor-prostaglandina D2	385.1996	M+H	17.2562	↓	↔	↔	↔
Ácido 2-hidroximiristico	243.1943	M+H	18.3399	↔	↑	↔	↔
Ácido Lesquerolico (Isomero B)	325.2708	M+H	21.7182	↓	↔	↔	↔
<i>Ácidos grasos de cadena muy larga</i>							
Ácido cerebronico	383.3519	M+H	21.9897	↑	↔	↔	↔
<i>Ácidos grasos de cadena ramificada</i>							
Ácido micolipanolico	411.3829	M+H	23.1852	↑	↔	↔	↔
Ácido 3-Hidroxi-11-metilestearico	313.2728	M+H	21.1241	↓	↔	↔	↔
Ácido 12,16-dimetilheptadecanoico	297.2788	M+H	22.1798	↑	↑	↔	↔
Priopionato de 3-metilen-7-metil-7- octenilo	211.1697	M+H	18.3171	↓	↔	↔	↔
Ácido 8,14-dimetilpentadecanoico	269.2472	M+H	21.2210	↓	↓	↔	↔
Ácido 2,3-metilenesuccinico	141.0193	M+H	2.8207	↑	↔	↔	↔

<i>Monogliceroles</i>							
MG(0:0/22:6(5Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-OH(4)/0:0)	399.2515	M+H-H ₂ O	21.9000	↓	↓	↔	↔
<i>Digliceridos</i>							
DG(18:1(11Z)/15:0/0:0)	579.4947	M+H	24.3755	↓	↔	↔	↔
DG(18:1(9Z)-O(12,13)/i-15:0/0:0)	593.4776	M+H	22.6404	↔	↓	↔	↔
DG(15:0/0:0/18:4n3)	573.4511	M+H	23.3244	↓	↔	↔	↔
DG(18:1(9Z)-O(12,13)/i-15:0/0:0)	593.4756	M+H	22.9344	↔	↓	↔	↔
DG(20:5(6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-OH(5)/0:0/a-15:0) isómero	615.4619	M+H	22.9100	↔	↓	↔	↔
DG(20:5(6E,8Z,11Z,14Z,17Z)-OH(5)/0:0/a-15:0) isómero	615.4615	M+H	22.6665	↓	↔	↔	↔
1-Hexadecanoil-2-(4-oxobutiril-sn-glicero-fosfoetanolamina	536.2977	M+H	15.9168	↓	↔	↔	↔
6-O-Acetylaustroinulina	363.2508	M+H	18.9155	↑	↔	↔	↔
FAHFA(18:4-(2-O-16:0))	529.4220	M+H	23.7529	↑	↔	↔	↔
DG(i-12:0/20:4(7E,9E,11Z,13E)-3OH(5S,6R,15S)/0:0)	607.4231	M+H	21.9426	↓	↔	↔	↔
DG(10:0/0:0/PGE2)	579.3873	M+H	17.9753	↔	↔	↑	↔
<i>Fosfolipidos</i>							
PS(22:2(13Z,16Z)/22:4(7Z,10Z,13Z,16Z))	890.5876	M+H	17.8604	↓	↔	↔	↔
1-eicosil-2-docosanoilglicero-3-fosfatoetanolamina	862.6910	M+COOH-H	25.7774	↓	↔	↔	↔
1-hexadecanoil-2-(5-oxo-valeroil)-sn-glicero-3-fosfoserina	594.3028	M+H	13.6980	↔	↔	↑↑	↔
<i>Terpenoides</i>							
Euclenosido E	649.3584	M+H	17.6978	↓	↔	↔	↔
Ácido A-ganosporerico	525.2468	M+H	23.2447	↓	↓	↔	↔
<i>Esteroles</i>							

Teasterona	447.3765	M+H	21.8972	↑	↔	↔	↔
Cinamato de germanicol	537.4130	M+H-H ₂ O	20.4446	↓	↔	↔	↔
Sulfato de androstan-3,17-diol	371.1883	M+H	17.7523	↓	↓	↔	↔
16-propil-3-metoxiestra-1,3,5-(10)-trieno-16β,17β-diol	343.2285	M+H	17.8357	↓	↔	↔	↔
<i>Derivados de sales biliares</i>							
Ácido 3α-7α-22-(S)-trihidroxi-5α-colestan-26-oico	501.3062	M-Cl	16.3387	↓	↔	↔	↔
Ácido coeglutamico	536.3118	M+H	20.9559	↔	↔	↑	↔
<i>Metabolismo de compuestos fenólicos</i>							
Ácido [2-metoxi-4-(3-oxobutil)fenil]oxidanesulfónico	273.0449	M+H	14.7489	↑↑	↑↑	↔	↔
Ácido 4-Hidroxi-5-(3',4'-dihidroxifenil-valerisulfónico)	305.0337	M+H	9.4993	↑	↑	↔	↔
Kaempferol glucoronido	461.0735	M+H	10.3778	↔	↑	↔	↔
Sulfato de [5-(7-Hidroxi-4-oxochromen-2-il)-2-metoxifenol]	345.0149	M+H	16.0480	↑	↔	↔	↔
Ácido ferulico-4-sulfato	254.9969	M+H-H ₂ O	26.2439	↑	↑	↔	↔
Ácido 3,4-dihidroxifenilvalerico-4-sulfato	289.0393	M+H	10.1357	↑	↑	↔	↔
Ácido (Z)-2,4-dihidroxi-6-(8-pentadecenil)benzoico	361.2369	M+H	16.3209	↔	↑	↔	↔
Sulfato de vainillina	230.9967	M+H	8.9474	↑	↑	↔	↔
Quercetina-7-glucuronido-3-ramnosido	623.1267	M+H	9.7212	↓↓	↔	↔	↔
Kaempferol-4-glucosido	475.0861	M+H	12.8909	↑	↔	↔	↔
Ácido dihidrocafeico-3-glucoronido	357.0828	M+H	3.9533	↓	↔	↔	↔
Duartina	331.1192	M+H	16.8973	↓	↔	↔	↔
Apigenina-7-(6"-metilglucuronido)	459.0949	M+H	12.2442	↑	↔	↔	↔
Lueoina-5-sulfónico	363.0171	M+H	26.2936	↓	↔	↔	↔
Luteolina-5-glucuronido	461.0752	M+H	11.6257	↔	↑	↔	↔

Formononetina-7-sulfato	347.0226	M+H	26.2213	↔	↓	↔	↔
Ácido 2-(5,7-dihidroxi-4-oxo-2-fenil-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-8-il)-3,5-dihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-4-il]oxdanesulfónico	497.0784	M+H	13.8085	↔	↔	↓	↔
<i>Metabolismo de metilxantinas</i>							
Ácido metilurico	181.0366	M+H	1.9395	↑↑	↑↑	↔	↔
Uridina	243.0612	M+H	1.6061	↔	↔	↔	↔
<i>Otros</i>							
4-[(2-Furanilmetil)tio]-2-pentanona	197.0656	M+H	1.7100	↑	↑	↔	↔
Asperugina B	385.2024	M+H	18.2699	↓	↓	↔	↔
3-α-hidroxireadona-Isomero	251.1258	M+H	22.9678	↓↓	↓↓	↔	↔
3-α-hidroxireadona-Isomero	251.1258	M+H	23.3690	↓↓	↓↓	↔	↔
N2-(γ-glutamil)-4-carboxyfenilhidrazina	316.0721	M+H	2.8609	↑	↔	↔	↔
Melleolida B	431.2079	M+H	13.6131	↓	↓	↔	↔
Peptido Desconocido A	492.2758	M+H	14.5375	↔	↔	↑↑	↔
Peptido Desconocido B	513.2144	M+H	15.4486	↔	↓	↔	↔
Cardiolipina	1157.676	M+H-H ₂ O			↔	↔	↔
(8:0/8:0/18:2(9Z,11Z)/18:2(9Z,11Z))	9		17.2999	↑			

Las comparaciones fueron realizadas entre dietas, considerando solamente como factor a la presencia o no del ingrediente de cacao, comparando en cada punto de muestreo. ↑: Incremento debido a la suplementación con el ingrediente. ↓: disminución debido a la suplementación con el ingrediente. ↑↑: Aparición del compuesto por suplementación con el ingrediente. ↓↓: Desaparición del compuesto por la suplementación con el ingrediente. ↔: no significativo TR: Tiempo de retención. STD: dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa

Los carbohidratos (**Cuadro 18**) mostraron diferencias significativas solamente en la dieta estándar, resultando disminuidos en la dieta suplementada con el ingrediente, a excepción de la D-Galactosa que incrementó durante la noche por la suplementación. Al comparar este patrón con los análisis de química sanguínea realizados al momento del sacrificio (**Cuadro 17**) se puede extrapolar el efecto del ingrediente como modulador de los carbohidratos en circulación, pues el manejo de la glucosa sanguínea sigue la misma tendencia: una disminución por el día al suplementar el ingrediente y un aumento en la noche.

La suplementación con los subproductos de cacao generó cambios en los lípidos presentes en el plasma de los animales alimentados con las dietas suplementadas con el ingrediente (**Cuadro 18**). El ácido 3-hidroxidodecandioco, un ácido graso de cadena media, apareció en los grupos estándar suplementados con el ingrediente, tanto de día como de noche; este ácido graso ha demostrado tener un efecto protector ante la neuroinflamación, mejorar la memoria y llevar a un estado de eubiosis a ratones C57bl/6 tratados con lipopolisacaridos para inducir daño neuronal ([You et al., 2022](#)). El ácido cerebrónico, un ácido de cadena muy larga incrementó en la dieta estándar por la adición del ingrediente, pero solo durante el día; este ácido se ha relacionado con la disminución en el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 y cáncer de páncreas ([Xu et al., 2021](#)). La presencia e incremento del ácido 3-hidroxidodecandioco y cerebrónico en animales alimentados con dieta estándar sugieren que la metabolización de los compuestos presentes en el ingrediente de cacao puede proteger al organismo de padecer algunas enfermedades degenerativas no transmisibles mientras se siga un estilo de vida saludable; investigaciones futuras serían necesarias para determinar si modificando las dosis de ingrediente pudiese tener el mismo efecto sobre una dieta alta en grasa.

De manera general, los ácidos grasos de cadena larga, fosfolípidos, terpenoides, monoglicéridos y diglicéridos en plasma disminuyeron durante el día al suplementarse el ingrediente en la dieta estándar (**Cuadro 18**). Algunos diacilglicerol, como el DG(15:0/0:0/18:4n3) se han establecido como indicadores

del síndrome metabólico y la resistencia a la insulina, indicando una prevención en estas dos enfermedades. Los diglicéridos son precursores para la síntesis de triglicéridos ([HMBD, s.f.a](#)), por lo que reducir la concentración de estos explica los resultados del Cuadro 17, donde los ratones con dieta estándar suplementada con el ingrediente disminuyeron su concentración de triglicéridos en sangre, tanto de día como de noche.

Esta tendencia encontrada tanto en el metabolismo de carbohidratos como en el de lípidos séricos nos habla de una regulación metabólica en función de la hora del día en que se consume el ingrediente. Patrones similares se reportaron en el estudio de [Hernandez-Gonzalez et al., \(2021\)](#) donde suministraron chocolate amargo a un grupo de mujeres con sobrepeso. Las pacientes que consumían el chocolate durante la mañana incrementaron la oxidación de lípidos y disminuyeron los niveles de glucosa en ayuno; por otro lado, al consumirlo por la tarde disminuyeron los niveles de hambre, incrementaron su actividad física y su oxidación de carbohidratos. Se sugiere así que los compuestos presentes en los subproductos de cacao podrían estar modulando diferentes rutas metabólicas dependiendo de momento del día en que se consumen.

En el caso de la dieta alta en grasa suplementada con el ingrediente, los cambios en los metabolitos plasmáticos no fueron tan variados como en el caso de la dieta estándar (**Cuadro 18**). La dieta alta en grasa suplementada con el ingrediente presentó un incremento en el diglicérido DG(10:0/0:0/PGE₂), anteriormente diglicéridos derivados de la PGE₂ se han relacionado con la reducción de los síntomas de colitis debido a que disminuye la producción de citocinas, por un mecanismo mediado por los receptores DP1 y PPAR_γ ([Alhouayek et al., 2018](#)). El plasma de la dieta alta en grasa suplementada con el ingrediente presentó la aparición de 1-hexadecanoil-2-(5-oxo-valeroil)-sn-glicero-3-fosfoserina, un fosfolípido de membrana relacionado con la señalización apoptótica; este compuesto ha sido evaluado respecto a su potencial para prevenir enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, demostrando un potencial para mantener

la homeostasis lípida en ratones con demencia ([Zhao et al., 2020](#)). Estos resultados sugieren que, aunque hay un efecto positivo en compuestos en plasma que se relacionan con prevenir la inflamación y enfermedades neurodegenerativas al suplementar la dieta alta en grasa con el ingrediente quizá sea necesaria una mayor de concentración del ingrediente para lograr un efecto mayor, como fue en el caso de la dieta estándar suplementada.

Debido a la suplementación con el ingrediente de cacao en los ratones, algunos compuestos derivados de los compuestos bioactivos del cacao incrementaron, o incluso aparecieron (indicado con doble flecha en dirección hacia arriba) después de la suplementación; este efecto se dio en el metabolismo de compuestos fenólicos y de metilxantinas. Los ácidos [2-metoxi-4-(3-oxobutil)fenil]oxidanesulfónico y metilúrico aparecieron en el metaboloma de los animales alimentados con la dieta estándar solamente cuando se suministraba el cacao, tanto de día como de noche. Compuestos derivados de la metabolización de fenoles incrementaron en los grupos estándar, pero este incremento fue principalmente durante el sacrificio de día. Esta diferenciación de la hora del día se debe a que, si bien su metabolismo y absorción comienza desde la boca, la mayor absorción se da en el intestino, por lo cual existen compuestos como el kaempferol y el ácido ferúlico que pueden tardar hasta 7 horas en metabolizarse ([Velderrain-Rodríguez et al., 2014](#)). De forma que, aunque los compuestos se consuman durante la fase activa, en este caso la noche, el efecto podría estarse reflejando hasta la fase de reposo, una vez que los compuestos están siendo metabolizados.

En la composición bioactiva de las dietas (**Cuadro 16**) se encontraron ácido ferúlico y ácido dihidroxibenzoico, estos dos compuestos aparecen metabolizados en plasma, teniendo un incremento al suplementar con cacao. Para el caso del ácido dihidroxibenzoico, su tiempo de metabolización es menor que para el ácido ferúlico ([Velderrain-Rodríguez et al., 2014](#)), es por eso que su incremento en plasma se aprecia durante la noche que es cuando hay un mayor consumo de alimento. Cuando se realizó una caracterización preliminar del extracto de ingrediente de

cacao por el mismo método que se procesaron las muestras biológicas (datos no mostrados) fue posible encontrar un perfil fenólico más variado incluyendo kaemperfol, apigenina y vainillina, tres compuestos cuyos metabolitos resultaron incrementados en el grupo estándar con suplementación con el cacao, tanto de día como de noche.

Además de los compuestos metabolizados por las reacciones de fase I y II, para los compuestos fenólicos existen otras rutas de metabolización, siendo una de las relevantes aquellas llevadas a cabo por el catabolismo de la microbiota intestinal. Los ácidos 4-Hidroxi-5-(3',4'-dihidroxifenil-valerisulfónico y 3,4-dihidroxifenilvalérico-4-sulfato (**Cuadro 18**) pertenecen a la familia de los ácidos hidroxifenilvaléricos, que son productos de degradación metabólica de los flavon-3-oles ([Mena et al., 2019](#)), familia que incluye a la catequina y epicatequina, dos de los tres compuestos fenólicos mayoritarios en el ingrediente desarrollado. Estos compuestos se han relacionado con beneficios a la salud, tales como disminuir la inflamación, factores como el NF- κ B, la concentración de óxido nítrico y de iNOS, así como a los leucotrienos; también se ha demostrado la reducción de la presión sanguínea y, cuando llegan a cerebro, estos compuestos pueden incrementar el número de neuritos y su longitud ([Mena et al., 2019](#)). Por lo que encontrar estos metabolitos en plasma indica que la microbiota intestinal está modificando los compuestos que llegan hasta el colon, generando así productos de degradación que podrían estar relacionados con los resultados encontrados en el presente proyecto.

b) Biodisponibilidad de compuestos en hígado.

Las muestras de hígado del modelo murino desincronizado alcanzaron un total de 2648 compuestos de interés biológico y de relevancia estadística ($p < 0.05$). La **Figura 27** presenta los PCAs de la variabilidad de los compuestos presentes en hígado, mostrando cada unidad experimental como un punto. La **Figura 27A**

muestra el análisis de variabilidad de comparado todos los grupos experimentales. El gráfico 2D de los componentes principales muestra que el primer componente, en el eje de las x, representa el 18.4 % de la variabilidad de los datos, mientras que el eje y explica solo el 14.3 %. En este caso, comparándolo con los resultados de plasma, la separación de los componentes no parece ser tan marcada, sin embargo, es posible delimitar el efecto de cada componente ya que las elipses correspondientes a las dietas si se muestran separadas. Una vez más, el componente uno es el efecto de la dieta, ya sea estándar o alta en grasa. Aun cuando se trata de un tejido diferente, es apreciable que la composición de la dieta sigue tiene un efecto predominante sobre el perfil metabólico. El segundo componente corresponde a la hora de sacrificio, teniendo una separación un poco menos notoria comparándola con el plasma (**Figura 24**), esto podría deberse a que el plasma, al estar en circulación, tiende a ser más dinámico que el hígado, donde los compuestos llegan una vez terminada su absorción y se almacenan por un tiempo para ser biotransformados ([Velderrain-Rodriguez et al., 2014](#)).

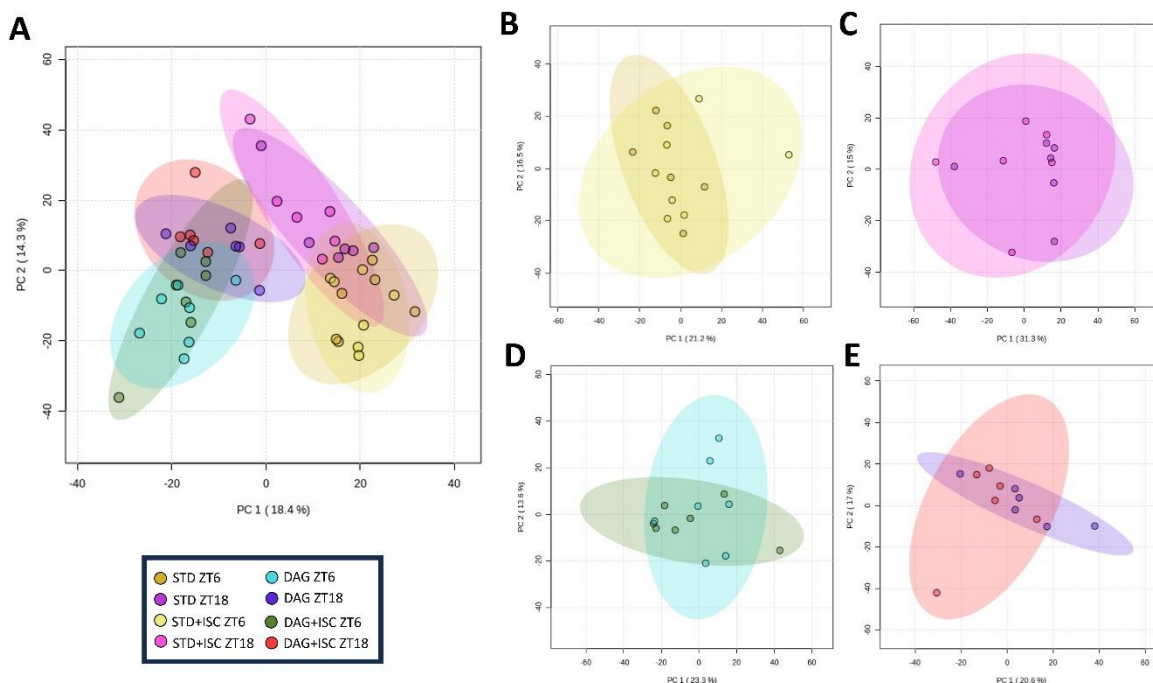


Figura 27. Análisis de componentes principales en el metaboloma de hígado.

A) Comparación entre todos los subgrupos. B) Comparación entre grupo estándar vs estándar con ingrediente al mediodía. C) Comparación grupo estándar vs estándar con ingrediente a medianoche. D) Comparación grupo alto en grasa vs alto en grasa con ingrediente al mediodía. E) Comparación grupo alto en grasa vs alto en grasa con ingrediente a medianoche. STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

En la **Figura 27A** no existe una separación de los individuos experimentales debido a la suplementación con el ingrediente de cacao, por lo que para evitar el posible enmascaramiento el efecto de la dieta y hora del día se presentan PCAs para cada pareja de subgrupos (**Figura 27B-E**) comparando solamente el efecto del ingrediente. Aun cuando se elimina el efecto de los dos componentes más fuertes, la dieta y la hora del día, las elipses se solapan y los puntos quedan dispersos entre sí. Lo anterior indica que en este caso la separación por la presencia, o ausencia, del ingrediente de cacao no tiene un efecto tan marcado como en el plasma.

Después del análisis de componentes principales, se realizó un ANOVA de una vía, considerando como factor a cada subgrupo, se encontraron en total que 847

compuestos varían por efecto de la dieta (estándar o alta en grasa), hora de sacrificio (mediodía o medianoche) o suplementación del ingrediente de cacao (**Figura 28**).

La **Figura 28** muestra el Heatmap de los compuestos relevantes en hígado, con la misma conformación que el presentado para el plasma: a lo ancho cada replica biológica y hacia abajo los compuestos estadísticamente significativos; arriba, las agrupaciones generadas por el software de manera automática. Al enfocarnos a lo ancho de la figura se aprecia que casi a la mitad del gráfico hay una división, la cual corresponde a la composición de la dieta (estándar o alta en grasa). Aun cuando se pueden ver dos clústeres marcados conforme a la composición de la dieta, algunos ratones el grupo alto en grasa se agrupan en el clúster de la dieta estándar; esto coincide con los PCAs donde la separación por la dieta y el tiempo de sacrificio no fue tan clara.

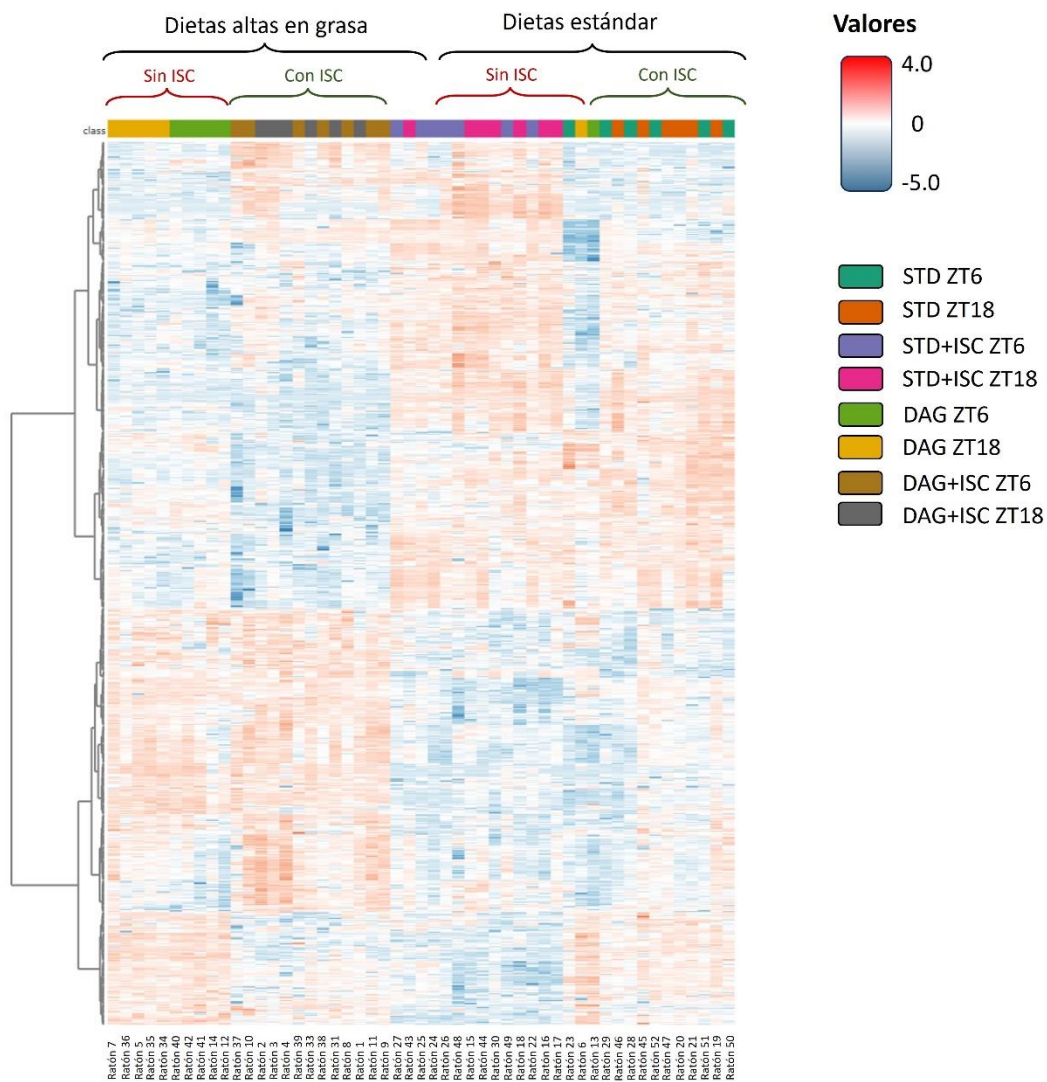


Figura 28. Heatmap de las correlaciones de los 847 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en hígado.

STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

En la **Figura 29** se muestra un Heatmap con el efecto global de los subgrupos experimentales, tomando solamente el promedio. En la parte superior se ubican los ocho subgrupos experimentales y hacia abajo los 847 compuestos con diferencias significativas en hígado; enmarcados en un cuadro y señalados con un número se presentan los clústeres (6) con patrón relevante para los resultados del proyecto.

En líneas a la derecha se presenta una escala para ubicar el número de compuestos.

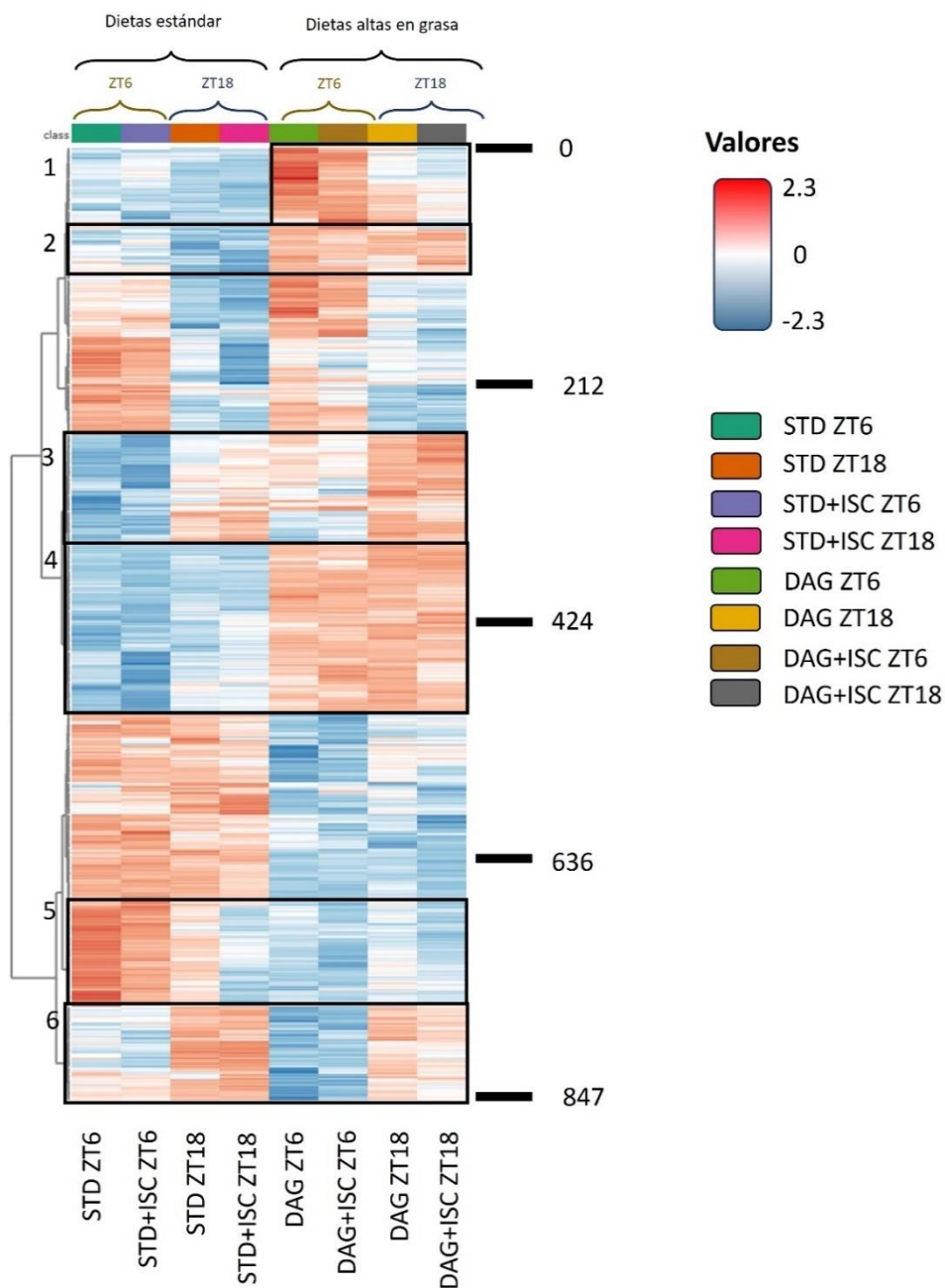


Figura 29. Heatmap de de los promedios por subgrupo, comparando los 847 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en hígado. STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

En el clúster 1 (**Figura 29**) se aprecia que 68 compuestos varían, en primera instancia por la dieta administrada, viéndose incrementados por la dieta alta en grasa, además, se ven modificados por la hora del día y en una menor proporción disminuyen por efecto del ingrediente: dieta alta en grasa suplementada con ingrediente y en sacrificio de noche tiene una composición del clúster similar a la dieta estándar. Este comportamiento es bastante similar en el clúster 2 y 4, donde 43 y 150 compuestos incrementan por la presencia de la grasa y disminuyen por adición del ingrediente. El caso del clúster 3 es relevante ya que se aprecia un cambio en la hora del día que están presentes 95 metabolitos: la dieta estándar tiene una menor concentración de estos durante el día, aumentando ligeramente durante la noche, estos niveles se equiparan a la dieta alta en grasa durante el día (con o sin ingrediente), haciendo que se expresen como en otro momento del día. El clúster 5 se compone de 92 compuestos, los cuales disminuyen por efecto de la dieta alta en grasa, pero es necesario resaltar que la dieta estándar con ingrediente se comporta similar a la dieta alta en grasa, sugiriendo un desbalance metabólico. Por último, en el clúster 6 se nota el efecto de la hora del día más que de la dieta, demostrando que el ingrediente no tiene una intervención tan marcada.

A pesar de que el ingrediente de cacao, en un análisis estadístico poco profundo, no parece tener un efecto relevante, en el presente proyecto las comparaciones entre subgrupos cuando se suplementa o no el ingrediente son claves. De los 847 compuestos con diferencias significativas en hígado, 91 se ven afectados por la suplementación con el ingrediente. Estos 91 compuestos fueron identificados utilizando bases de datos y se presentan en el Cuadro **19**.

Cuadro 19. Cambios en la abundancia relativa de metabolitos hepáticos analizados mediante UPLC-MS.

Predicción	m/z	Fórmula	Aducto	RT	STD vs STD- ISC ZT6	STD vs STD- ISC ZT18	HFD vs HFD- ISC ZT6	HFD vs HFD- ISC ZT18
<i>Carbohidratos</i>								
L-Arabinitol-5-fosfato	277.0283	C ₅ H ₁₃ O ₈ P	M+H-COOH	1.7439	↔	↔	↑	↔
2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato	215.0324	C ₅ H ₁₃ O ₇ P	M+H	1.9004	↔	↓	↔	↔
<i>Aminoácidos y derivados</i>								
4-Metilhexanoilcarnitina	254.1747	C ₁₄ H ₂₇ NO ₄	M+H-H ₂ O	15.4927	↔	↓	↔	↔
Sulfoxido de carbocisteína	194.0135	C ₅ H ₉ NO ₅ S	M+H	2.3149	↔	↔	↑	↔
s-Carboximetil-L-cisteína	224.0234	C ₅ H ₉ NO ₄ S	M+H-COOH	2.2136	↔	↔	↑	↔
N-acetil-L-metionina	190.0527	C ₇ H ₁₃ NO ₃ S	M+H	4.6870	↑	↔	↔	↔
Taurina	124.0052	C ₂ H ₇ NO ₃ S	M+H	3.6046	↔	↔	↔	↓
4-Metil-L-glutamato	160.0628	C ₆ H ₁₁ NO ₄	M+H	1.2824	↑	↔	↔	↔
L-Valina,N-(2-hidroxi-3-butenil)	186.1126	C ₉ H ₁₇ NO ₃	M+H	11.4331	↑	↔	↔	↔
N-Lauroil-Metionina	376.2148	C ₁₇ H ₃₃ NO ₃ S	M+H-COOH	14.0130	↔	↓↓	↔	↔
2,3-Dihidroxibenzoilserina	286.0621	C ₁₀ H ₁₁ NO ₆	M+H-COOH	1.2876	↔	↔	↑	↔
N-Acetilglucosamina 6-fosfato	300.0480	C ₈ H ₁₆ NO ₉ P	M+H	1.5403	↑	↔	↔	↔
Tiocisteína	151.9825	C ₃ H ₇ NO ₂ S ₂	M+H	2.5780	↔	↓	↔	↔
<i>Péptidos</i>								

Ac-Tyr-OEt	250.1075	C ₁₃ H ₁₇ NO ₄	M+H	11.2508	↔	↔	↔	↓
γ-Glu-Asp	261.0727	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₇	M+H	1.7129	↔	↑↑	↔	↔
Gly-Lγ-glutamyl-2-(1-metil-4-(nitrosotio)-4-piperidinil)glicil	418.1366	C ₁₅ H ₂₅ N ₅ O ₇ S	M+H	1.7554	↔	↔	↑	↔
Thr-Glu	292.1200	C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₅	M+H-COOH	5.1102	↔	↔	↑	↔
Kinetensin 4-7	616.2901	C ₂₆ H ₃₇ N ₉ O ₆	M+H-COOH	12.8619	↔	↓	↔	↔
Tripeptido A	488.1692	C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₇	M+H-COOH	11.2428	↔	↔	↑	↔
Tripeptido B	379.1757		M+H-COOH	12.7304	↔	↔	↑	↔
Tripeptido C	401.1575	C ₁₅ H ₂₈ N ₆ O ₆ S	M+H-H ₂ O	8.5467	↔	↔	↑	↔
Tripeptido D	391.2108	C ₁₈ H ₂₈ N ₆ O ₄	M+H	12.9364	↔	↓	↔	↔
Tripeptido E	330.1253	C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O ₇	M+H	2.5894	↑	↔	↔	↔
Tripeptido F	429.1698	C ₁₇ H ₂₆ N ₆ O ₅	M+Cl	13.5026	↔	↓	↔	↔
Tripeptido G	430.1721	C ₂₀ H ₂₅ N ₅ O ₆	M+H	13.5005	↔	↓	↔	↔
Tripeptido H	394.1608	C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₇	M+H	8.4254	↔	↔	↑	↔
Ácidos grasos de cadena corta								
3-hidroxibutirato glucosilado	303.1458	C ₁₄ H ₂₆ O ₈	M+H-H ₂ O	12.2346	↔	↔	↔	↓
Ácido 4-hidroxibutirico	103.0403	C ₄ H ₈ O ₃	M+H	1.9135	↑	↔	↔	↔
Ácidos grasos de cadena media								
Caprilloglicina	200.1283	C ₁₀ H ₁₉ NO ₃	M+H	12.8153	↑	↔	↔	↔
Ácidos grasos de cadena larga								
Ácido (10E,12Z)-(9S)-9-hidroxiperoxiocadeca-10,12-dinoeico	311.2209	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	M+H	16.4491	↔	↓	↔	↔
Ácido 9,10-epoxioctadecanoico	313.2360	C ₁₈ H ₃₄ O ₄	M+H	16.1996	↔	↓	↔	↔
9,12,13-TriHOME/Isomero	329.2330	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	M+H	13.5025	↔	↓	↔	↔
9,10,13-TriHOME/Isomero	329.2289	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	M+H	14.3845	↔	↓	↔	↔
Ácidos grasos de cadena muy larga								

Tromboxano B2	351.2121	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	M+H-H ₂ O	11.9571	↔	↔	↔	↓
(13S,17R,20S)-d14-16- NeuroF[16R,19R]	393.2230	C ₂₂ H ₃₄ O ₆	M+H	12.8637	↔	↓	↔	
Ácido 5S-hidroxi-6R- (Scisteinglicinil)- 7E,9E,11E,14Z- eicosatetranoico	495.2575	C ₂₅ H ₄₀ N ₂ O ₆ S	M+H	12.9017	↔	↔	↔	↓
(13S,17R,20S)-d14-16- NeuroF[16R,19R]	393.2212	C ₂₂ H ₃₄ O ₆	M+H	14.2558	↔	↔	↔	↓
Ácido (+/-)-11,12-dihidroxi- 5Z,8Z,14Z,17Z- eicosanoico/Isómero	335.2157	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	M+H	16.4097	↔	↓	↔	↔
Ácido (+/-)-11,12-dihidroxi- 5Z,8Z,14Z,17Z- eicosanoico/Isómero	335.2152	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	M+H	14.8268	↔	↓	↔	↔
Ácido 3,9,15-docosatriynoico	327.2338	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	M+H	20.1558	↔	↓	↔	↔
<i>Diglicéridos</i>								
DG(8:0/0:0/8:0)	343.2466	C ₁₉ H ₃₆ O ₅	M+H	14.9401	↔	↓	↔	↔
DG(22:6(4Z,7Z,11E,13Z,15E, 19Z)-2OH(10S,17)/2:0/0:0	475.2635	C ₂₇ H ₄₀ O ₇	M+H	13.7655	↔	↔	↑	↔
DG(8:0/8:0/0:0)	343.2467	C ₁₉ H ₃₆ O ₅	M+H	14.7696	↔	↓	↔	↔
DG(9D3/13D5/0:0)	727.5469	C ₄₅ H ₇₆ O ₇	M+H	20.5790	↔	↓	↔	↔
<i>Fosfolípidos</i>								
1-(2-metoxi-13-metil- pentadecanil)-sn-glicero-3- fosfoserina	512.3060	C ₂₃ H ₄₈ NO ₉ P	M+H	11.4029	↑	↔	↔	↔
PA(10:0/PGJ2)	641.3460	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₀ P	M+H	11.0044	↔	↔	↑	↔
PS(22:1(11Z)/0:0)	614.3270	C ₂₈ H ₅₄ NO ₉ P	M+H	11.6702	↔	↓	↔	↔
1-(9Z-nonadecenoil)-glicero- 3-fosfato	449.2717	C ₂₂ H ₄₃ O ₇ P	M+H	12.8549	↑	↔	↔	↔

PA(22:5(4Z,7Z,10Z,13Z,19Z)-O(16,17)/2:0)	575.2189	C ₂₇ H ₄₁ O ₉ P	M+H	12.3132	↑	↔	↔	↔
PA(22:6(4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z)-OH(14)/22:2(13Z,16Z))	815.5158	C ₄₇ H ₇₇ O ₉ P	M+H	21.5280	↔	↔	↑	↔
1-(11Z-docosenoil)-glicerol-3-fosfoserina	614.3250	C ₂₈ H ₅₄ NO ₉ P	M+Cl	11.5182	↔	↓	↔	↔
1-hexadecanoil-2-(5-hidroxi-8-oxo-6E-octenoil)-sn-glicerol-3-fosfo-(1-sn-glicerol)	673.3065	C ₃₀ H ₅₅ O ₁₂ P	M+H	12.0223	↔	↓	↔	↔
PS(20:4(5Z,8Z,11Z,13E)+=O(15)/15:0)	782.4685	C ₄₁ H ₇₀ NO ₁₁ P	M+H	19.6126	↔	↓	↔	↔
1-dodecanoil-glicerol-3-fosfo-(1'-sn-glicerol)	427.2037	C ₂₁ H ₃₂ O ₉ P	M+H	12.8125	↔	↔	↓	↔
1-hexadecanoil-2-(5-oxo-7-carboxi-6E-heptenoil)-sn-glicerol-3-fosfoetanolamida	656.2881	C ₂₉ H ₅₂ NO ₁₁ P	M+Cl	12.0563	↔	↓	↔	↔
PC(2:0/20:3(5Z,8Z,14Z)-O(11S,12R))	636.3002	C ₃₀ H ₅₂ NO ₉ P	M+Cl	12.0758	↔	↓	↔	↔
PA(18:1(12Z)-2OH(9,10)/2:0)	509.2475	C ₂₃ H ₄₃ O ₁₀ P	M+H	14.1150	↔	↓	↔	↔
PE(20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/22:6(4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z)-2OH(10S,17))	840.4727	C ₄₇ H ₇₂ NO ₁₀ P	M+H	20.1059	↔	↓	↑	↔
PA(LTE4/2:0)	634.2490	C ₂₈ H ₄₆ NO ₁₁ PS	M+H	1.4670	↔	↔	↔	↓
PS(P-18:0/22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z))	818.5401	C ₄₆ H ₇₈ NO ₉ P	M+H	20.9542	↔	↔	↑	↔
PS(6:0/6:0)	454.1884	C ₁₈ H ₃₄ NO ₁₀ P	M+H	1.4759	↔	↔	↔	↓
PS(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	862.4369	C ₄₆ H ₇₀ NO ₁₀ P	M+Cl	28.2365	↑	↔	↔	↔
PS(PGE2/16:1(9Z))	864.4438	C ₄₂ H ₇₂ NO ₁₃ P	M+H	28.2617	↑	↔	↔	↔

Terpenoides								
(3β,17α,23R)-17,23-Epoxi-3,29-dihidroxi-27-norlanost-8-eno-15,24-diona	471.3065	C ₂₉ H ₄₄ O ₅	M+H	15.1262	↔	↓↓	↔	↔
Esteroles								
11b-Hidroxiprogesterona	331.1871	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	M+H	12.4299	↔	↔	↔	↓
6-metilprednisona	373.2027	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	M+H	14.2611	↔	↓	↔	↔
11-Ketoprogesterona	373.2017	C ₂₁ H ₂₈ O ₃	M+H-COOH	14.4945	↔	↓	↔	↔
Tetrahidroaldosterona	409.2204	C ₂₁ H ₃₂ O ₅	M+H-COOH	12.4691	↔	↓	↔	↔
11β-hidroxi-4-pregnen-3,20-diona	375.2158	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	M+H	14.6329	↔	↓	↔	↔
Metabolismo de compuestos fenólicos								
Daidzein-7-glucuronido	411.0772	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	M+H-H ₂ O	1.2764	↔	↔	↑	↔
6-Hidroxi-4'-metoxiflavona	267.0691	C ₉ H ₁₇ N ₃ O ₅	M+H-COOH	14.5558	↔	↔	↑	↔
(2S)-5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona-6-glucosido	449.1092	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	M+H	1.5367			↑	
Quercetina 7,3',4'-trimetil eter	343.0821	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	M+H	2.2035	↑	↔	↔	↔
Malvidin-3-(6"-cafeoil-glucosido)	654.1567	C ₃₂ H ₃₁ O ₁₅	M+H	2.2121	↑	↔	↔	↔
2-aminofenol sulfato	169.9914	C ₆ H ₇ NO ₄ S	M+H-H ₂ O	6.1891	↑	↔	↔	↔
5,2'-dihidroxi-7,8,6'-trimetoxiflavvanona-2'-O-glucuronido	521.1405	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	M+H	2.4082	↔		↑	
Catequin-3-Gallato	441.0927	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀	M+H	1.4215	↑	↔	↔	↔
Metabolismo de metilxantinas								
Hidroxidesmetilpiperinsulfato	406.0760	C ₁₆ H ₂₁ NO ₇ S	M+Cl	1.3933	↑	↔	↔	↔
2-Hidroxietansulfonato	124.9936	C ₂ H ₆ O ₄ S	M+H	1.6569	↔	↔	↑	↔
Otros								

Ácido deoxiribonucleico	504.1082	C ₁₅ H ₃₁ N ₃ O ₁₃ P ₂	M+H-H ₂ O	2.2109	↔	↔	↑	↔
Dihidrozeatin-9-N-glucosido-O-glucosido	544.2365	C ₂₂ H ₃₅ N ₅ O ₁₁	M+H	11.7462	↔	↓	↔	↔
N(6)-(Dimetilalil)adenosina-5'difosfato	494.0923	C ₁₅ H ₂₃ N ₅ O ₁₀ P ₂	M+H	2.2148	↔	↔	↑	↔
Furost-5-ene-3β,22,26-triol	453.2720	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	M+Cl	14.8189	↔	↔	↔	↓
D-alanyl-(R)-lactato	142.0509	C ₆ H ₁₁ NO ₄	M+H-H ₂ O	2.2349	↔	↓	↔	↔
2,4-dihidroxi-7,8-dimetoxi,2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-ona-2-glucosido	448.1124	C ₁₆ H ₂₁ NO ₁₁	M+H-COOH	1.5604	↔	↔	↑	↔

Las comparaciones fueron realizadas entre dietas, considerando solamente como factor a la presencia o no del ingrediente de cacao, comparando en cada punto de muestreo. ↑: Incremento debido a la suplementación con el ingrediente. ↓: disminución debido a la suplementación con el ingrediente. ↑↑: Aparición del compuesto por suplementación con el ingrediente. ↓↓: Desaparición del compuesto por la suplementación con el ingrediente. ↔: no significativo TR: Tiempo de retención. STD: dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa

En hígado, a diferencia de plasma, la suplementación con el cacao tuvo efecto en todas las comparaciones: dieta estándar día y noche, dieta alta en grasa día y noche. Debido a la naturaleza del tejido hepático, una mayor cantidad de aminoácidos, péptidos y sus derivados se vieron modificados por la presencia del ingrediente de cacao, resaltando la relevancia de la fracción proteica del mismo. El Cuadro 19 muestra que los siguientes grupos de compuestos resultaron modulados por la suplementación con el ingrediente: carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ácidos grasos de cadena corta, media, larga y muy larga, diglicéridos, fosfolípidos, terpenoides, esteroides y compuestos del metabolismo de fenoles y metilxantinas.

Los aminoácidos y sus derivados presentaron un patrón común (**Cuadro 19**), independientemente de si la dieta fue estándar o alta en grasa: Su concentración aumentaba durante el día por efecto del ingrediente y disminuía durante la noche. De acuerdo con [Koronowski et al., \(2019\)](#), los aminoácidos hepáticos presentan un comportamiento circadiano donde su pico máximo de concentración es alrededor del ZT8, y por la noche disminuyen. Cuando existe un cambio de fase, o alteraciones en la expresión de *Bmal1* en hígado los aminoácidos pierden su ritmo circadiano ([Koronowski et al., 2019](#)), el hecho que la suplementación con el ingrediente regule su concentración incluso en una dieta alta en grasa reafirma su potencial de revertir la desincronización que se ha observado en diversas pruebas a lo largo del proyecto. La 4-metilhexanoilcarnitina es un derivado del aminoácido carnitina, las acilcarnitinas se relacionan con el transporte de ácidos grasos hacia la mitocondria, permitiendo la β -oxidación, este compuesto disminuye durante la noche por suplementación con el cacao, lo que podría traducirse como un efecto opuesto a lo esperado pues la máxima concentración de los derivados de carnitina sucede por la noche ([Greco et al., 2021](#)).

Los péptidos fueron uno de los grupos de compuestos más susceptibles en hígado, a la suplementación con el ingrediente de cacao (**Cuadro 18**). El grupo con la dieta alta en grasa resultó más susceptible a los cambios de los péptidos hepáticos, incrementándose durante la noche. Si bien se detectaron 8 tripéptidos,

de los cuales la mayoría incrementó durante el día, con los datos obtenidos la fragmentación de masas no es posible determinar al 100 % su estructura; sin embargo, se conoce que la totalidad de estos péptidos tienen al menos un aminoácido aromático. La vaina y cascarilla de cacao se han caracterizado respecto a su contenido de aminoácidos ([Campos-Vega et al., 2018](#)), destacando un alto contenido de aminoácidos esenciales como es el caso de aquellos con estructura aromática. Esto indica que las proteínas presentes en el ingrediente de cacao están ejerciendo un efecto sobre el hígado.

Uno de los grupos de compuestos de mayor interés para este proyecto era la presencia de AGCC en hígado. Como se mencionó en la sección de antecedentes, un estudio realizado por [Tahara et al., \(2018\)](#) demostró que la suplementación con AGCC podía modular el reloj hepático y resincronizarlo. En el metaboloma del hígado se modificó la concentración de dos AGCC: el 3-hidroxibutirato glucosilado (disminuido para el grupo DAG+ISC en ZT18) y el ácido 4-hidroxibutírico (Incrementado para el grupo STD+ISC en ZT6). El primero de estos proviene de la ruta de la cetogénesis, los ratones con una dieta estándar presentan valores muy bajos de este compuesto a lo largo del día mientras que aquellos ratones con el reloj desincronizado muestran mayor concentración durante la noche ([Greco et al., 2021](#)); la reducción de este metabolito por la suplementación con el ingrediente en el grupo alto en grasa (a medianoche) se podría traducir como un efecto protector ante la desincronización por la grasa. El ácido 4-hidroxibutírico es un precursor del ácido γ -aminobutírico (GABA), al igual que el GABA es un potente neurotransmisor relacionado con la producción de dopamina; en dosis incrementadas, como en el tratamiento de dieta estándar a mediodía, contribuye a la inducción del sueño ([HMDB, s.f.b](#)). La presencia del ácido 4-hidroxibutírico en hígado podría ser el responsable de los resultados de actividad locomotora (**Figura 12**) donde al suplementar con el ingrediente en una dieta estándar los patrones de actividad sugieren un mejor descanso en la fase diurna.

Siguiendo patrones similares a los obtenidos en plasma, los ácidos grasos de cadena larga y muy larga, así como los diglicéridos resultaron disminuidos, específicamente durante la noche. Los lípidos en hígado presentan su máxima concentración en el ZT6 y ZT18, la concentración de estos depende totalmente de los lípidos provenientes de los alimentos ingeridos ([Koronowski et al., 2019](#)). Esta disminución de lípidos hepáticos es más efectiva para la dieta estándar, sugiriendo que bajo un estilo de vida saludable es más efectiva la protección hepática; para los animales alimentados con la dieta alta en grasa esta reducción de tres ácidos grasos de cadena muy larga sugiere que, aunque existe una protección ante las dislipidemias, la dosis del ingrediente de cacao necesitaría modificarse para lograr una mayor protección. De los 19 fosfolípidos identificados en el metaboloma hepático, 11 disminuyeron por la suplementación con el ingrediente (**Cuadro 18**). De forma similar al resto de los compuestos lipídicos, los terpenoides y esteroides también disminuyeron por la inclusión del ingrediente en la dieta tanto para la dieta estándar como la alta en grasa. Si se extrapolan estos resultados de lípidos acumulados en hígado y los lípidos circulantes (**Cuadro 17**), así como las modificaciones en la expresión de *Ppara* (**Figura 15**) podría sugerirse que el mecanismo de protección del ingrediente de cacao ante la desincronización por dietas altas en grasa involucra la regular del metabolismo lipídico.

Los metabolitos de compuestos fenólicos identificados en hígado aumentaron en su totalidad por la suplementación con el ingrediente, encontrando este efecto solamente en el sacrificio a mediodía. Como se mencionó con anterioridad, los compuestos fenólicos necesitan seguir una ruta de liberación, absorción y circulación para llegar al hígado, terminar su metabolismo y de ahí proceder a distribuirse a diferentes órganos y tejidos ([Velderrain-Rodriguez et al., 2014](#)); esto explicaría por qué los metabolitos de compuestos fenólicos incrementan durante el día, que ya ha pasado el tiempo suficiente después de la fase nocturna donde se consume el 80% del alimento total ([Kohsaka et al., 2007](#)). Si bien el efecto de los compuestos fenólicos, o extractos ricos en estos, sobre el ciclo circadiano y la regulación de genes de reloj está estudiado y comprobado ([Aragonès et al., 2016](#);

[Ávila-Román et al., 2021](#); [Casanova et al., 2014](#); [Ribas-Latre et al., 2015a](#); [Ribas-Latre et al., 2015b](#)) el mecanismo de reacción a través del cual se modulan los genes de reloj sigue en estudio.

Este es el primer trabajo donde se reporta un efecto directo sobre los genes de reloj en hígado, así como el incremento de los metabolitos de compuestos fenólicos y de metilxantinas en el mismo tejido, todo esto proveniente de una matriz alimenticia compleja. Algunos de los metabolitos encontrados en el tejido hepático coinciden con los compuestos no-metabolizados de extractos, bebidas o moléculas aisladas, tal es el caso de la catequin-3-gallato y el hidroxidesmetilpiperinsulfato.

Debido a la similitud en composición bioactiva con los subproductos de cacao, el GSPE es un referente para comprender de manera más directa el efecto de los compuestos fenólicos sobre el reloj. En el estudio de [Rodríguez et al., \(2024\)](#) se caracterizó el GSPE encontrando algunos precursores de los metabolitos presentes en hígado como la (epi)-catequin-galato; entre los metabolitos hepáticos desarrollados por la suplementación con el GSPE los autores reportan la recuperación del ritmo del ácido 2-hidroxibutírico, un precursor del GABA, tal como lo encontrado en el presente trabajo. En el estudio de [Ribas-Latre et al., \(2015a\)](#), ratas alimentadas con una dieta estándar y suplementadas de forma crónica con GSPE tuvieron patrones similares en la expresión de *Bmal1* y *Per2* a los obtenidos en el presente trabajo cuando se evaluaron en hígado. Esto nos sugiere que los compuestos obtenidos del metabolismo de los compuestos fenólicos son responsables de la modulación de genes de reloj en hígado.

Al provenir de una matriz como el cacao, el ingrediente diseñado también aportó un alto contenido de metilxantinas a las dietas (**Cuadro 15**). La piperina, metilxantina proveniente de la pimienta y precursor del hidroxidesmetilpiperinsulfato, es capaz de revertir la desincronización de genes de reloj en hígado de ratones alimentados con dieta alta en grasa ([Zhang et al., 2024](#)). Los efectos protectores de la piperina se relacionaron con cambios en la microbiota intestinal y sus metabolitos excretados ([Zhang et al., 2024](#)). Esto sugiere que el

ingrediente de subproductos de cacao puede estar modulando la actividad locomotora y la expresión de genes de reloj en hígado a través de la microbiota intestinal, por lo que el análisis de esta podría contribuir a elucidar el mecanismo a través del cual el ingrediente de cacao protege contra la desincronización circadiana.

El amplio metaboloma modificado por acción del ingrediente en el hígado nos reafirma los resultados encontrados en cuanto a la expresión de genes de reloj. El reloj hepático se adapta a cambios en la alimentación y a su vez controla el metabolismo de glucosa, lípidos y las rutas de oxidación ([Eckel-Mahan et al., 2013](#)). La regulación de los genes de reloj en hígado por modificaciones en la dieta se puede deber principalmente a los cambios en el metaboloma hepático. Estos resultados coinciden con la literatura de crononutrición hasta el momento: los compuestos derivados de los ácidos grasos de cadena corta presentes en hígado modifican los genes de reloj en función de la hora del día en que son administrados ([Tahara et al., 2018](#)), los compuestos fenólicos, sus metabolitos y catabolitos regulan la expresión de *Bmal1* y *Per2* ([Ribas-Latré et al., 2015a,b](#); [Rodriguez et al., 2024](#)) y las metilxantinas y sus metabolitos protegen ante la desincronización circadiana por dietas altas en grasa ([Zhang et al., 2014](#)).

c) Biodisponibilidad de compuestos en tejido cerebral no hipotalámico.

El último análisis metabolómico se realizó en el resto del cerebro sin contar el hipotálamo, resultando así en tejido cerebral no hipotalámico y presentó un total de 395 compuestos de interés biológico y con relevancia estadística. La **Figura 30** muestra un PCA de la variabilidad de los compuestos presentes en tejido cerebral no hipotalámico, cada punto representa una unidad experimental. El hecho que los compuestos presentes en una sección del cerebro sean una cuarta parte del total en plasma se explica con la presencia de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual

regula la entrada de compuestos al sistema nervioso central (Velásquez-Jiménez et al., 2021).

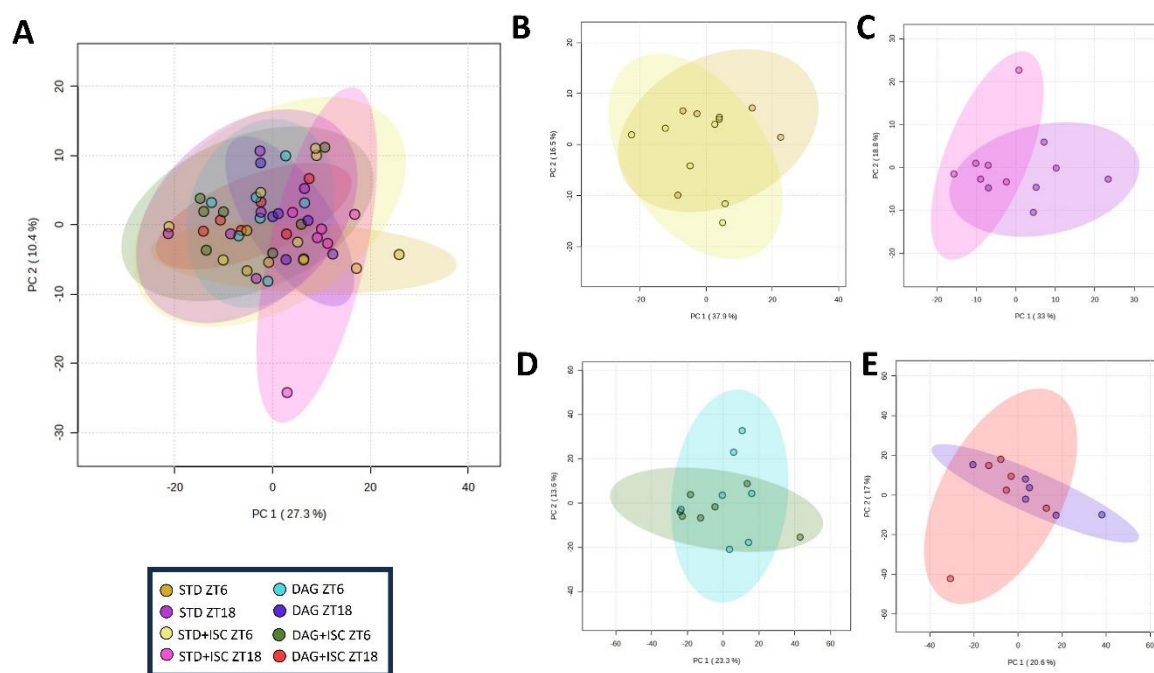


Figura 30. Análisis de componentes principales en el metaboloma del tejido cerebral no hipotalámico.

A) Comparación entre todos los subgrupos. B) Comparación entre grupo estándar vs estándar con ingrediente al mediodía. C) Comparación grupo estándar vs estándar con ingrediente a medianoche. D) Comparación grupo alto en grasa vs alto en grasa con ingrediente al mediodía. E) Comparación grupo alto en grasa vs alto en grasa con ingrediente a medianoche. STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

En la **Figura 30A** se aprecia que, si bien el componente uno representa el 27.3% de la variabilidad de los resultados, en realidad el diagrama presenta a todos los individuos experimentales agrupados en el centro del mapa. A diferencia del hígado y el plasma, el componente que explica la mayor variabilidad de los datos es la hora de sacrificio. Esto último se puede apreciar en las dietas estándar, suplementadas

o no con el ingrediente (**Figura 30B-C**), que al observar sus PCAs por separado existe una tendencia a mayor separación basada en la hora de sacrificio, la cual representa casi el 40 % de la variabilidad. Que la variabilidad de las muestras se explique por el tiempo de sacrificio y no por la composición de la dieta depende de BHE ya que esta solo permite el acceso a moléculas y nutrientes esenciales, evitando la entrada de algunos xenobióticos, generando así que las diferencias se deban al dinamismo del cerebro y su metabolismo ([Velásquez-Jiménez et al., 2021](#)).

La **Figura 31** muestra el Heatmap de los compuestos con diferencias significativas en el tejido cerebral no hipotalámico (ANOVA, $p < 0.05$) que en este caso fueron 27 metabolitos. En la parte superior del Heatmap se muestran los clústeres creados automáticamente por el software Metaboanalyst, el cual agrupa los individuos experimentales de acuerdo con patrones de concentración de compuestos. Los clústeres formados agrupan individuos de todos los tratamientos experimentales, de forma variada y sin un patrón aparente; esto es consistente con los PCAs donde la mayoría de los puntos se conglomeraban en el mismo sector (**Figura 30A**).

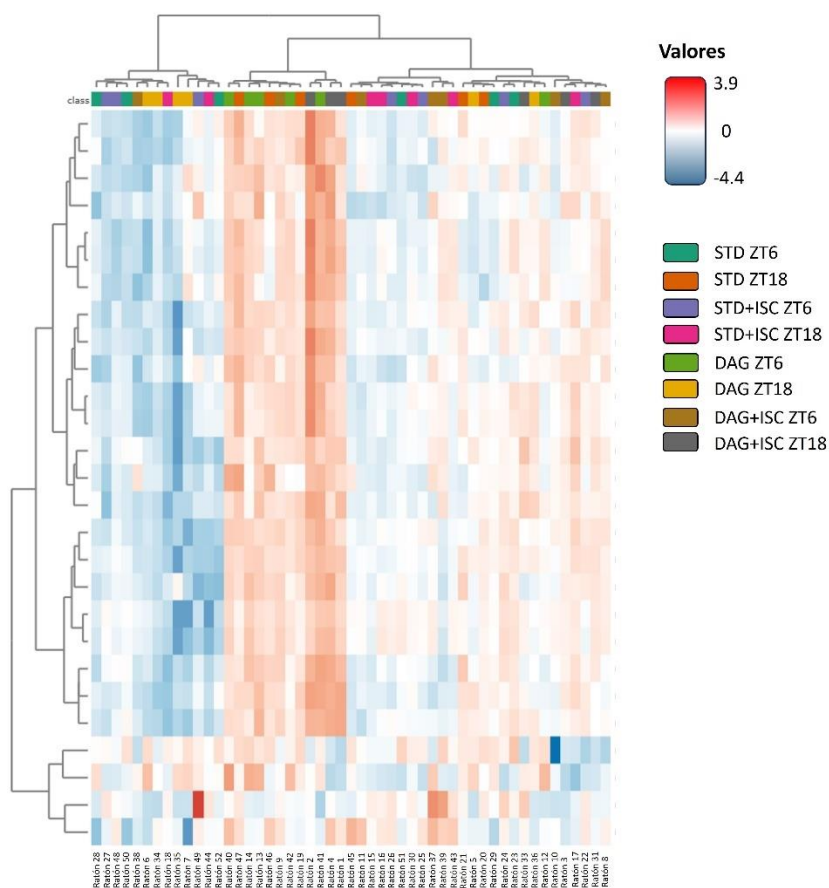


Figura 31. Heatmap de las correlaciones de los 27 compuestos con diferencias significativas ($p<0.05$) en tejido cerebral no hipotalámico. STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

Con el fin de observar mejor los patrones de concentración de los 27 compuestos se realizó un Heatmap con el promedio por subgrupo (**Figura 31**). Se encontraron cuatro clústeres en el comportamiento de los compuestos, los cuales dependieron en su totalidad de la hora del día y la suplementación con el ingrediente de cacao. El clúster 1 muestra que el metabolito depende de la hora de día, expresándose mayormente durante la noche. El clúster 2 muestra 23 compuestos que durante el día se ven reducidos por la suplementación con el ingrediente, algo similar al clúster 4 donde los animales alimentados por una dieta alta en grasa disminuyen estos metabolitos durante la noche cuando se suplementa con el ingrediente. El clúster 3 es el más relevante para esta sección, pues hay 23

compuestos que incrementan en la dieta estándar durante la noche por la suplementación con el ingrediente. Estos resultados indican que, aunque en un análisis general como el PCA no se observan diferencias por adición del ingrediente, con análisis estadístico más profundo se pueden apreciar los efectos de la suplementación.

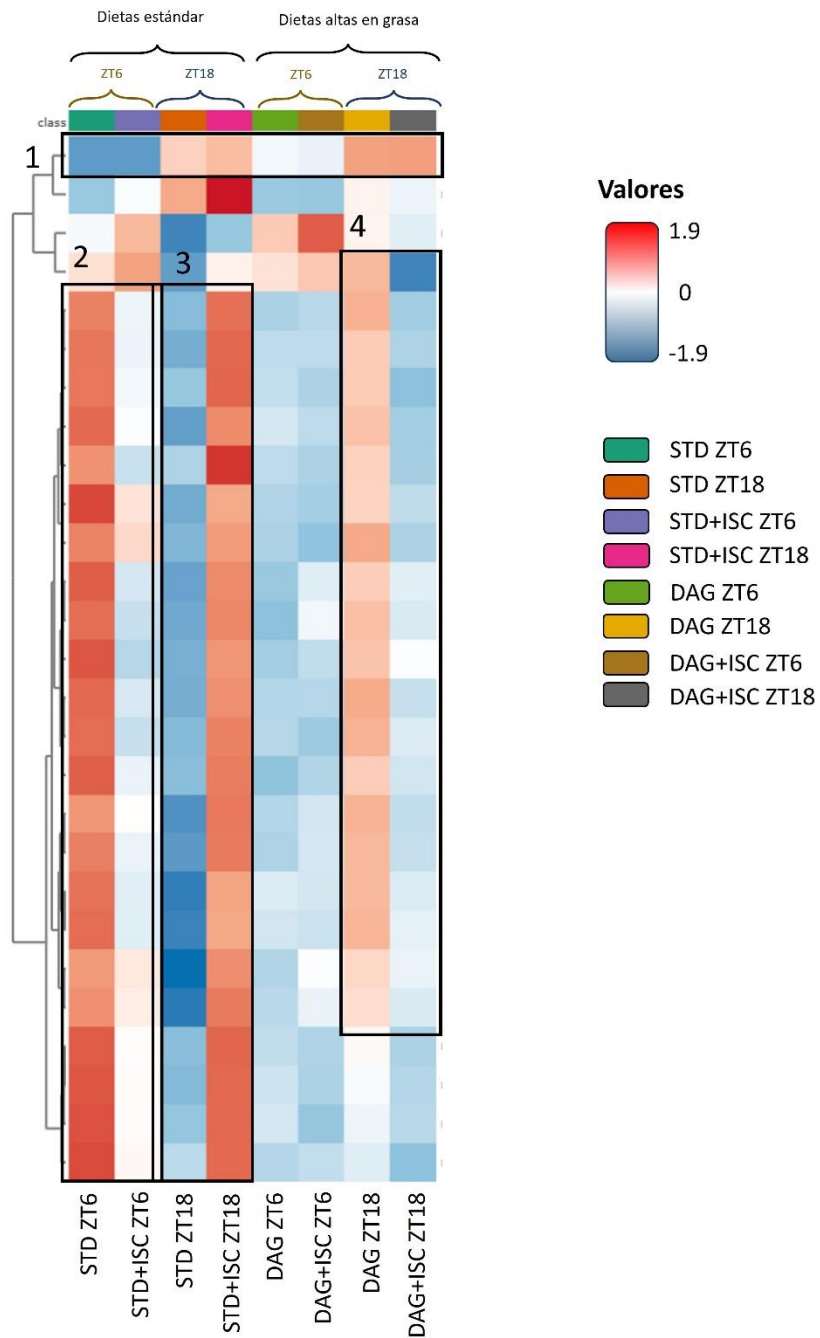


Figura 32. Heatmap de los promedios por subgrupo, comparando los 27 compuestos con diferencias significativas ($p < 0.05$) en cerebro.
 STD: Dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa. ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche.

En el Cuadro **20** se muestran los compuestos identificados en cerebro, considerando solamente aquellos que resultaron significativos al comparar el efecto de la presencia o ausencia del ingrediente de cacao, siendo un total de 19 metabolitos. Estos metabolitos se clasifican en carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos de cadena larga, esteroides, fosfolípidos y esfingolípidos. Todos los compuestos identificados en cerebro, a excepción de la D-fructosa-1,6-bisfosfato, se vieron incrementados por la presencia del ingrediente de cacao con dieta estándar en el sacrificio a medianoche. La presencia de D-fructosa-1,6-bisfosfato en tejido cerebral no hipotalámico se puede explicar gracias a la presencia de transportadores y metabolizadores de fructosa en células cerebrales ([Spagnuolo et al., 2020](#)). Si bien el efecto de la fructosa en cerebro está menos estudiado que en otros órganos, se ha reportado que puede disminuir la función cognitiva debido a una disminución del factor BDNF y las proteínas de sinapsis, incrementar la ingesta de alimento, llevar a un estado de inflamación por aumento de citocinas, disminuir la función mitocondrial, incrementar el estrés oxidativo y, por ende, incrementar la oxidación de lípidos y proteínas ([Spagnuolo et al., 2020](#)).

Cuadro 20. Cambios en la abundancia relativa de metabolitos en tejido cerebral no-hipotalámico analizados mediante UPLC-MS.

Predicción	m/z	Formula	Aducto	RT	STD vs STD -ISC ZT6	STD vs STD- ISC ZT18	HFD vs HFD -ISC ZT6	HFD vs HFD- ISC ZT18
<i>Carbohidratos</i>								
D-Fructosa-1,6-bifosfato	338.99027	C ₆ H ₁₄ O ₁₂ P ₂	M+H	2.859189 5	↔	↔	↔	↑
<i>Aminoácidos</i>								
Tetradecenoilcarnitina	368.2799	C ₂₁ H ₃₉ NO 4	M+H	19.86316 7	↔	↑	↔	↔
N-stearoyrina	277.2165	C ₂₁ H ₄₁ NO 4	M+H	20.06701	↔	↑	↔	↔
<i>Ácidos grasos de cadena larga</i>								
Acido (E)-Octadec-13-en-11-ynoico	277.2165	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	M+H	20.0670	↔	↑	↔	↔
Acido 22-oxo-tricosanoico	403.30541 2	C ₂₃ H ₄₄ O ₃	M+Cl	21.56222 7	↔	↑	↔	↔
<i>Esteroles</i>								
5α-Androstan-17β-ol propionato	331.26405 9	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	M+H	21.44284	↔	↑	↔	↔
Di acetato de Androst-4-ene-3α, 17β-diol	373.23540 5	C ₂₃ H ₃₄ O ₄	M+H	21.23392 3	↔	↑	↔	↔
<i>Fosfolípidos</i>								
PA(12:0/14:1(9Z))	561.35680 5	C ₂₉ H ₅₅ O ₈ P	M+H	20.43233 5	↔	↑	↔	↔

PA(P-16:0/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z))	677.45533 1	C ₃₉ H ₆₇ O ₇ P	M+H	20.32153 3	↔	↑	↔	↔
PA(12:0/18:4(6Z,9Z,12Z,15Z))	611.35949 7	C ₃₃ H ₅₇ O ₈ P	M+H	19.60819 8	↔	↑	↔	↔
PA(15:0/0:0)	395.22054 8	C ₁₈ H ₃₇ O ₇ P	M+H	20.30962 4	↔	↑	↔	↔
<i>Esfingolípidos</i>								
3-Cetospingosina	342.26336 2	C ₁₈ H ₃₅ NO 2	M+H- COOH	19.53841	↔	↑	↔	↔
5-Hidroxi,3E-esfingosina	370.29543 2	C ₁₈ H ₃₇ NO 2	M+H- COOH	19.76225 5	↔	↑	↔	↔
<i>Otros</i>								
Acido 3-(1H-indol-3-yl)-2-(octadecanoilamino)propionico	515.35126 4	C ₂₉ H ₄₆ N ₂ O ₃	M+H- COOH	20.39929 6	↔	↑	↔	↔
N-palmitoil GABA	340.28492 9	C ₂₀ H ₃₉ NO 3	M+H	19.64192	↔	↑	↔	↔
Acido 2-hidroxi-6-pentadecilbenzoico	347.25738 8	C ₂₂ H ₃₆ O ₃	M+H	19.77800 2	↔	↑	↔	↔

Las comparaciones fueron realizadas entre dietas, considerando solamente como factor a la presencia o no del ingrediente de cacao, comparando en cada punto de muestreo. ↑: Incremento debido a la suplementación con el ingrediente. ↓: disminución debido a la suplementación con el ingrediente. ↑↑: Aparición del compuesto por suplementación con el ingrediente. ↓↓: Desaparición del compuesto por la suplementación con el ingrediente. ↔: no significativo TR: Tiempo de retención. STD: dieta estándar. DAG: Dieta alta en grasa

Los metabolitos identificados en el cerebro son principalmente lípidos, esto se debe a la protección de la BHE ante la entrada de compuestos. La BHE está formada por uniones estrechas que permiten el paso de ciertas moléculas que cumplen con requisitos bien establecidos: tener menos de 5 donadores para formar puentes de hidrogeno, menos de 10 aceptores de puentes de hidrogeno, pesar menos de 500 Da y tener un LogP de menos de 4.15, estas se conocen como las reglas de Lipinski. Además, compuestos altamente lipofílicos, como los identificados en el Cuadro **20**, con un peso molecular de entre 300 y 600 Da pueden cruzar al cerebro por difusión pasiva ([Velásquez-Jiménez et al., 2021](#)).

En un estudio realizado por [Zhang et al., \(2022\)](#) se encontró que suplementar a ratones con compuestos fenólicos de té verde, caracterizados por su alto contenido de catequinas, similar al ingrediente de cacao, se modificaba la microbiota intestinal y algunos de sus metabolitos llegaban hasta el hipotálamo, destacando un incremento en la acetylcarnitina, un derivado de la carnitina. En el Cuadro **19** se muestra que la tetradecenoilcarnitina se ve incrementada por la suplementación con el ingrediente de cacao, posiblemente por cambios en la microbiota intestinal, abriendo una vez más la posibilidad de que los compuestos presentes en los subproductos de cacao son catabolizados por esta y se distribuyen en los diferentes tejidos. En este mismo estudio se demostró que la mayoría de los compuestos modificados en cerebro pertenecen a moléculas lipídicas.

El incremento de la 3-cetoesfingosina por efecto del ingrediente de cacao podría traer beneficios a la salud y protección ante enfermedades neurodegenerativas. La 3-cetoesfingosina es un precursor de la ceramida, que a su vez se transforma en esfingomielina ([Maceyka y Spiegel, 2014](#)); la cual ha demostrado tener un rol relevante en procesos celulares y respuestas inflamatorias además de tener un rol crítico en la integridad de las vainas de mielina, relacionadas con la maduración axonal y el desarrollo neuronal ([Schneider et al., 2019](#)). Además, la 3-cetoesfingosina puede inducir autofagia en células cancerígenas, teniendo así un efecto protector ante el cáncer ([Ordóñez et al., 2016](#)).

En el Cuadro 19 se muestra que el N-pamioil-GABA se ve incrementado durante la noche para el grupo que consumió la dieta estándar con la suplementación del ingrediente de cacao, este compuesto es un derivado del GABA, un neurotransmisor con varias funciones. Se ha reportado que la falta de GABA en el sistema nervioso induce ráfagas de actividad neuronal, seguidos de periodos de reposo más largos, lo que lleva a desincronización en los ritmos circadianos (Maejima et al., 2021). La transmisión de GABA a través de las neuronas AVP lleva a la coordinación entre la expresión de los genes de reloj en el núcleo supraquiasmático y la actividad diaria de los animales, mediante la regulación de la actividad neuronal (Maejima et al., 2021; Ono et al., 2020).

El incremento del N-pamioil-GABA en el metaboloma del cerebro después de la suplementación con el ingrediente de cacao podría ser el mecanismo de acción de la regulación de los genes de reloj en hipotálamo. Aunque las modificaciones de este compuesto en la dieta alta en grasa suplementada no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0.05$) si presentó un aumento (**Cuadro 20**). Estos resultados se relacionan con la protección ante la desincronización por dieta alta en grasa al suplementar con el ingrediente de cacao: la actividad locomotora del grupo alto en grasa con el ingrediente logró recuperarse de forma similar al grupo estándar, además que la expresión de *Bmal1* pudo recuperar su ritmicidad y niveles de expresión; sin embargo la expresión de *Per2* resultó con un cambio de fase indicando un efecto opuesto, pudiendo ser explicado con la tendencia a incrementar ($p > 0.05$). De forma que el ingrediente de cacao podría estar modulando la expresión de genes de reloj en el hipotálamo, que a su vez modula la actividad locomotora, via GABA, por lo que estudios adicionales serían necesarios para establecer dosis efectivas para la completa protección ante la desincronización circadiana por dietas altas en grasa.

d. Integración de los resultados obtenidos en el modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa

La **Figura 33** muestra la integración del efecto del ingrediente de subproductos de cacao en el modelo murino desincronizado, separado de acuerdo con el tipo de dieta correspondiente: estándar o alta en grasa. Se muestra de derecha a izquierda los efectos sobre la composición dietaria y bioquímica sanguínea, seguido de los efectos de estos cambios sobre la biodisponibilidad de compuestos bioactivos, el efecto de estos cambios en los genes de reloj y al final, como todas estas modificaciones se representan en la actividad locomotora. Las interacciones entre evaluaciones se muestran con flechas punteadas.

Comenzando con el tratamiento correspondiente para la dieta estándar, en el plasma de los animales suplementados con el ISC se identificó la presencia de catequina, epicatequina y teobromina; la presencia de estos compuestos en la dieta ocasionó que, en hígado, hubiera un incremento de los derivados de fenoles y metilxantinas en ZT6 como son el ácido 4-Hidroxi-5-(3',4'-dihidroxifenil-valerisulfónico y ácido 3,4-dihidroxifenilvalérico-4-sulfato. Estos metabolitos, derivados de fenoles, en hígado podrían estar relacionados con el incremento de ácidos grasos relacionados con neuroprotección como el ácido cerebrónico, la disminución de lípidos plasmáticos y la aparición de metabolitos de compuestos bioactivos. La disminución de lípidos séricos se pudo observar en la reducción de triglicéridos en ZT6 y ZT18 al momento del sacrificio. En cerebro, hubo un aumento de ácidos grasos de cadena larga y el N-pamioil GABA, en ZT18.

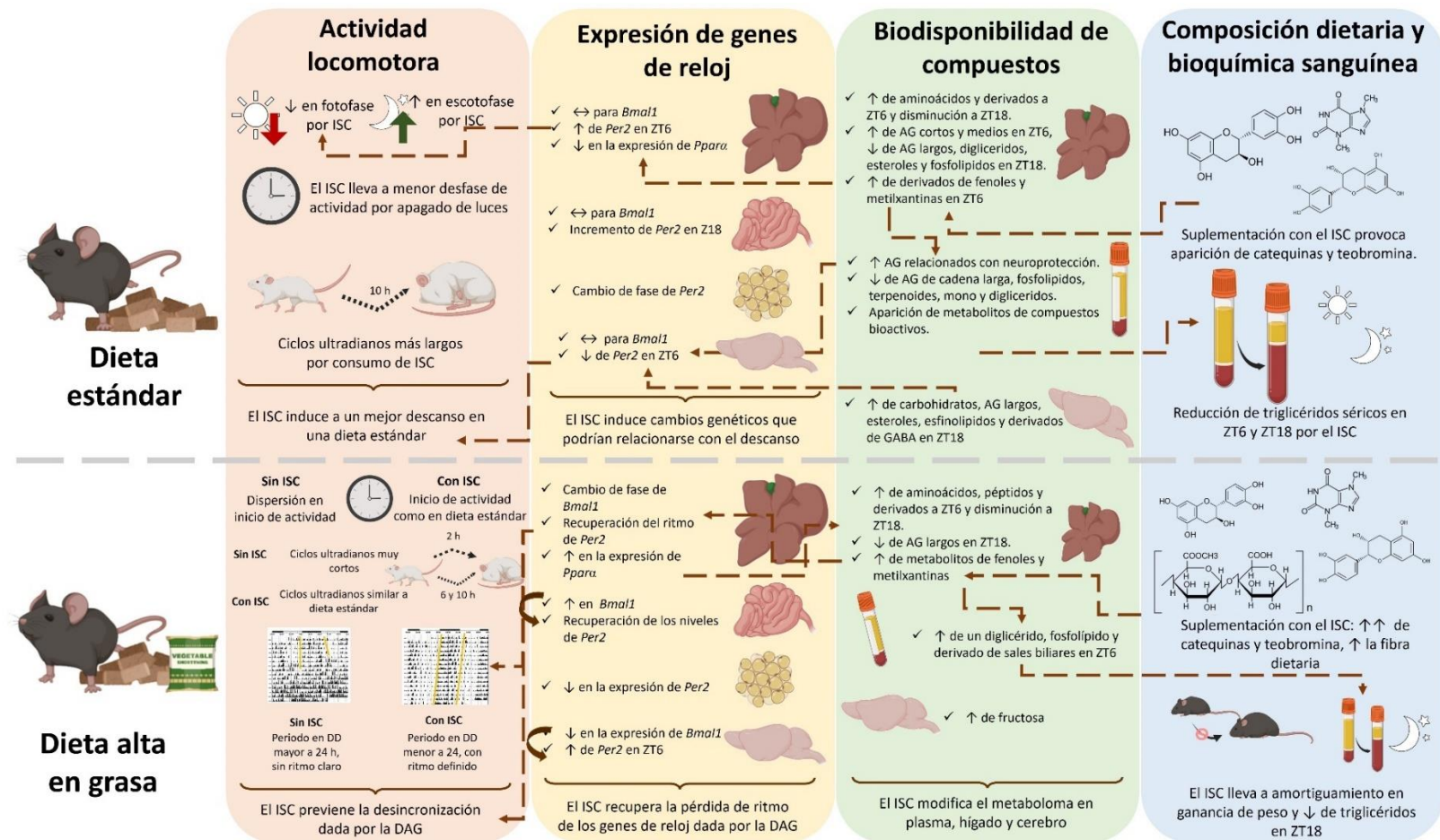


Figura 33. Integración del efecto de la suplementación del ingrediente de subproductos de cacao sobre el modelo murino desincronizado por dieta alta en grasa.

ISC: Ingrediente de subproductos de cacao. DAG: Dieta alta en grasa. ↑: Aumento. ↓: Reducción. ↑↑: Aparición de. ↔: sin cambios significativos. ZT6: Sacrificio a mediodía. ZT18: Sacrificio a medianoche. Flechas punteadas indican efectos entre secciones del trabajo. Flechas sólidas indican interacciones en la misma sección.

Con la dieta estándar, la expresión de genes de reloj se vio modificada por la suplementación con el ingrediente, pudiendo ser ocasionada por las alteraciones en la biodisponibilidad de algunos compuestos. En hígado, los derivados de fenoles y metilxantinas en ZT6 podrían ser los responsables de la disminución en la expresión de *Ppara* y el incremento de *Per2* en ZT6; mientras que en hipotálamo la presencia de algunos ácidos grasos relacionados con la neuroprotección en plasma y el derivado de GABA en tejido no hipotalámico, podrían ser los responsables de la disminución de la expresión de *Per2* en ZT6. Estas modificaciones en los genes de reloj, tanto en hígado como en cerebro podrían ser los responsables de que la actividad locomotora de los animales indicara un mejor descanso al suplementarse con el 6 % de ingrediente: menos actividad en la fase de descanso, mayor actividad en fase activa, menor desfase de inicio de actividad y ciclos ultradianos más largos.

Con la dieta alta en grasa el efecto del ingrediente de subproductos de cacao fue distinto a cuando se administró la dieta estándar. La suplementación con el 6 % de ingrediente fue suficiente para provocar un incremento en la fibra dietaria (al compararla con la dieta alta en grasa) y llevó a la aparición de catequinas y teobromina en el perfil fenólico de la dieta. La presencia de estos compuestos en la dieta provocó que en hígado incrementaran los metabolitos derivados de fenoles y metilxantinas (como 6-Hidroxi-4'-metoxiflavona y 2-Hidroxietansulfonato), así como la disminución de ácidos grasos de cadena larga en ZT18; opuesto al hígado, en plasma se presentó un incremento de compuestos lipídicos en ZT6. Estos cambios en el perfil lipídico, dependientes de la hora de sacrificio explican por qué para el sacrificio en ZT18 se encontró una disminución de los triglicéridos sanguíneos; mientras que el hecho de que durante el ZT6 no hubiera una mejoría en estos, podrían explicar por qué solamente hubo un amortiguamiento en la ganancia de peso sin lograr equiparar a la dieta estándar.

Las modificaciones en el metaboloma de plasma, hígado y cerebro debido a la suplementación con el ingrediente se relacionan con la expresión de genes de reloj en los diferentes tejidos. Los metabolitos de fenoles y metilxantinas incrementados

en hígado podrían ser los responsables de la recuperación del ritmo de *Per2* en el mismo tejido; sin embargo, la señalización también puede ser hacia la otra dirección donde el incremento en los niveles de expresión de *Ppara* podría ser responsables de los cambios en el perfil lipídico del plasma. El efecto del ingrediente sobre los genes de reloj llevó a una interacción *en bucle* de estos mismos donde la propia regulación de *Bmal1* en íleon e hipotálamo podría estar regulando a *Per2* generando que, a nivel de íleon, se regule a niveles similares a la dieta estándar. Además, en cerebro se observó un aumento de *Per2* en el ZT6, similar a lo presentado para hígado en la dieta estándar, este efecto podría deberse también a la presencia de catequinas.

Debido a que la suplementación con el ingrediente de subproductos de cacao llevó a recuperar la pérdida del ritmo de los genes de reloj, que se ocasionó por la dieta alta en grasa, la actividad locomotora se vio modificada. Los animales con la dieta alta en grasa y suplementados con el ingrediente de cacao, a diferencia de los que solamente consumieron la dieta alta en grasa, presentaron menos dispersión en el inicio de actividad y ciclos ultradianos más largos cuando se evaluó su actividad en ciclos de 12:12 h luz/oscuridad. En el caso de la actividad en oscuridad constante, los animales suplementados con el ingrediente de cacao tuvieron un periodo menor a 24 horas (estadísticamente similar a aquellos con dieta estándar) y con un ritmo definido. Estos resultados nos indican que el ingrediente de subproductos de cacao previene la desincronización inducida por la dieta alta en grasa, siguiendo un mecanismo de acción que modifica el metaboloma de distintos tejidos, llevando a la regulación y recuperación del ritmo de genes de reloj, con la consecuente mejora de la actividad locomotora.

X. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se diseñó y caracterizó un ingrediente a base de subproductos de cacao, específicamente vaina y cascarilla (1:2). De acuerdo con las normativas internacionales, este ingrediente es alto en fibra, bajo en grasas y fuente de proteína, además de tener como compuestos bioactivos principales a la catequina, epicatequina y al ácido gálico.

La suplementación con 6 % del ISC a una dieta estándar o alta en grasa, no tuvo efectos sobre el consumo de alimentos o parámetros morfológicos. Se observó mejora en el metabolismo lipídico al reducir los lípidos en plasma e hígado. Además, la suplementación del ISC ocasionó modificaciones sobre la actividad locomotora de los animales al recuperar el periodo del ritmo circadiano de actividad locomotora después de la exposición a una dieta alta en grasa, además de reducir ritmos ultradianos y la dispersión del inicio de la actividad. Cuando el ingrediente se suplementó en una dieta estándar se encontró una mejora en los patrones de descanso.

Los cambios ocasionados en la actividad locomotora se explicaron una vez que se evaluó el efecto del ingrediente sobre los genes de reloj. Se encontró que, en hígado, tejido adiposo, intestino y cerebro el ingrediente moduló la expresión de *Bmal1* y *Per2* previniendo los cambios negativos ocasionados por la dieta alta en grasa. Esta regulación genética y de actividad locomotora fue modulada por los compuestos presentes en el ingrediente de subproductos de cacao.

Los compuestos del ISC fueron biodisponibles de forma selectiva en plasma, hígado, tejido y cerebral no hipotalámico, identificándose metabolitos y catabolitos de compuestos fenólicos y metilxantinas, así como derivados de AGCC provenientes de la fibra. Además, la suplementación con el ingrediente de cacao modificó el metaboloma de los tejidos estudiados.

De acuerdo con los resultados, el efecto del ingrediente de cacao sobre un modelo murino desincronizado por una dieta alta en grasa es protegerlo ante esta desincronización. Posiblemente el mecanismo de acción del ingrediente esté en los metabolitos encontrados en los tejidos evaluados, resultando relevante la presencia de derivados de compuestos fenólicos, metilxantinas y ácidos grasos de cadena corta. Además, la modulación del metabolismo lipídico resulta clave para generar esta protección ante la presencia de grasas en la dieta. Tanto los metabolitos identificados como la modulación de los lípidos están regulando la expresión de genes de reloj, previniendo los efectos secundarios de la dieta alta en grasa; la recuperación de la expresión y oscilación de los genes de reloj termina traducándose a una regulación de la actividad locomotora, promoviendo un comportamiento circadiano similar a un animal con un estilo de vida saludable.

Experimentos posteriores son necesarios para continuar dilucidando el mecanismo de acción. Por ejemplo, la caracterización de la microbiota intestinal para determinar qué microorganismos podrían estar modulando el catabolismo de compuestos y/o como el ingrediente modula la microbiota; además, la identificación/cuantificación en heces de ácidos grasos de cadena corta u otros metabolitos con función de cronobióticos. También se propone realizar evaluaciones modificando la dosis del ingrediente de cacao, si bien con una suplementación con 6 % se tuvieron resultados benéficos en el modelo, algunos parámetros podrían mejorarse al ajustar la dosis. Este ingrediente podría ser una alternativa para prevenir la desincronización circadiana y otros efectos adversos ocasionados por una dieta alta en grasa.

XI. REFERENCIAS

- Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., *et al.* (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *The Journal of Neuroscience*, 22(1), 350.
- Adam, C. L., Thomson, L. M., Williams, P. A., & Ross, A. W. (2015). Soluble fermentable dietary fibre (pectin) decreases caloric intake, adiposity and lipidaemia in high-fat diet-induced obese rats. *PloS one*, 10(10), e0140392.
- Adamafio, N. (2013). Theobromine toxicity and remediation of cocoa by-products: An overview. *Journal of Biological Sciences*, 13(7), 570-576.
- Adi-Dako, O., Ofori-Kwakye, K., Boakye-Gyasi, M. E., Oppong Bekoe, S., *et al.* (2017). In vitro evaluation of cocoa pod husk pectin as a carrier for chronodelivery of hydrocortisone intended for adrenal insufficiency. *Journal of Drug Delivery*, 2017, 8284025.
- Alhouayek, M., Buisseret, B., Paquot, A., Guillemot-Legrís, O., & Muccioli, G. G. (2018). The endogenous bioactive lipid prostaglandin D2-glycerol ester reduces murine colitis via DP1 and PPAR γ receptors. *The FASEB Journal*, 32(9), 5000-5011.
- Aparecida Crispim, C., & Carliana Mota, M. (2019). New perspectives on chrononutrition. *Biological Rhythm Research*, 50(1), 63-77.
- Aragonès, G., Suárez, M., Ardid-Ruiz, A., Vinaixa, M., *et al.* (2016). Dietary proanthocyanidins boost hepatic nad⁺ metabolism and sirt1 expression and activity in a dose-dependent manner in healthy rats. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- Arble, D. M., Bass, J., Laposky, A. D., Vitaterna, M. H., & Turek, F. W. (2009). Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity*, 17(11), 2100-2102.
- Arola-Arnal, A., Cruz-Carrión, Á., Torres-Fuentes, C., Ávila-Román, J., *et al.* (2019). Chrononutrition and polyphenols: Roles and diseases. *Nutrients*, 11(11).
- Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., & Kroon, P. A. (2009). High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7298-7303.
- Aschemann-Witzel, J., Varela, P., & Peschel, A. O. (2019). Consumers' categorization of food ingredients: Do consumers perceive them as 'clean label' producers expect? An exploration with projective mapping. *Food Quality and Preference*, 71, 117-128.
- Aschoff, J. (1981). *A survey on biological rhythms* (pp. 3-10). Springer US.
- Ávila-Román, J., Soliz-Rueda, J. R., Bravo, F. I., Aragonés, G., Suárez, M., Arola-Arnal, A., ... & Muguerza, B. (2021). Phenolic compounds and biological rhythms: Who takes the lead?. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 77-85.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., *et al.* (2001). Differential functions of mper1, mper2, and mper3 in the scn circadian clock. *Neuron*, 30(2), 525-536.

- Ballance, H., & Zhu, B. (2021). Revealing the hidden reality of the mammalian 12-h ultradian rhythms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(7), 3127-3140.
- Ballard, C. R., & Maróstica, M. R. (2019). Chapter 10 - health benefits of flavonoids. In M. R. S. Campos (Ed.), *Bioactive compounds* (pp. 185-201): Woodhead Publishing.
- Baloyannis, S. J., Mavroudis, I., Mitilineos, D., Baloyannis, I. S., & Costa, V. G. (2015). The hypothalamus in Alzheimer's disease: a Golgi and electron microscope study. *American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®*, 30(5), 478-487.
- Barger, P. M., & Kelly, D. P. (2000). PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends in cardiovascular medicine*, 10(6), 238-245.
- Bariexca, T., Ezdebski, J., Redan, B. W., & Vinson, J. (2019). Pure polyphenols and cranberry juice high in anthocyanins increase antioxidant capacity in animal organs. *Foods*, 8(8), 340.
- Barišić, V., Petrović, J., Lončarević, I., Flanjak, I., *et al.* (2021). Physical properties of chocolates enriched with untreated cocoa bean shells and cocoa bean shells treated with high-voltage electrical discharge. *Sustainability*, 13(5), 2620.
- Bechtold, D. A., & Loudon, A. S. (2013). Hypothalamic clocks and rhythms in feeding behaviour. *Trends in neurosciences*, 36(2), 74-82.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of "antioxidant power": The frap assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bjursell, M., Gerdin, A.-K., Lelliott, C. J., Egecioglu, E., *et al.* (2008). Acutely reduced locomotor activity is a major contributor to western diet-induced obesity in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology Metabolism*, 294(2), E251-E260.
- Bornfeldt, K. E., & Tabas, I. (2011). Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell metabolism*, 14(5), 575-585.
- Botella-Martínez, C., Lucas-Gonzalez, R., Ballester-Costa, C., Pérez-Álvarez, J. Á., *et al.* (2021). Ghanaian cocoa (theobroma cacao L.) bean shells coproducts: Effect of particle size on chemical composition, bioactive compound content and antioxidant activity. *Agronomy*, 11(2), 401.
- Branecky, K. L., Niswender, K. D., & Pendergast, J. S. (2015). Disruption of daily rhythms by high-fat diet is reversible. *PloS one*, 10(9), e0137970.
- Brown, L. A., Fisk, A. S., Potheary, C. A., & Peirson, S. N. (2019). Telling the time with a broken clock: quantifying circadian disruption in animal models. *Biology*, 8(1), 18.
- Budai, Z., Balogh, L., & Sarang, Z. (2019). Short-term high-fat meal intake alters the expression of circadian clock-, inflammation-, and oxidative stress-related genes in human skeletal muscle. *International Journal of Food Sciences Nutrition*, 70(6), 749-758.
- Bunger, M. K., Wilsbacher, L. D., Moran, S. M., Clendenin, C., *et al.* (2000). Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103(7), 1009-1017.

- Campos-Vega, R., Nieto-Figueroa, K. H., & Oomah, B. D. (2018). Cocoa (theobroma cacao L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 81, 172-184.
- Carlberg, C., Hooft van Huijsduijnen, R., Staple, J. K., DeLamar, J. F., et al. (1994). RZR, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Molecular Endocrinology*, 8(6), 757-770.
- Carvas, J. M., Vukolic, A., Yepuri, G., Xiong, Y., Popp, K., Schmutz, I., ... & Yang, Z. (2012). Period2 gene mutant mice show compromised insulin-mediated endothelial nitric oxide release and altered glucose homeostasis. *Frontiers in physiology*, 3, 337.
- Casanova, E., Baselga-Escudero, L., Ribas-Latre, A., Cedó, L., et al. (2014). Chronic intake of proanthocyanidins and docosahexaenoic acid improves skeletal muscle oxidative capacity in diet-obese rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 25(10), 1003-1010.
- Castro-Barquero, S., Lamuela-Raventós, R. M., Doménech, M., & Estruch, R. (2018). Relationship between mediterranean dietary polyphenol intake and obesity. *Nutrients*, 10(10), 1523.
- Cedernaes, J., Huang, W., Ramsey, K. M., Waldeck, N., et al. (2019). Transcriptional basis for rhythmic control of hunger and metabolism within the agrp neuron. *Sleep Medicine*, 64, S57-S58.
- Cermakian, N., & Sassone-Corsi, P. (2000). Multilevel regulation of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 59-67.
- Chamaidán-Laines, R. J. (2020). Efecto inhibitorio del ácido cítrico en el pardeamiento de la placenta de cacao (*Theobroma cacao*) previo a la obtención de harina mediante deshidratado adiabático. (Ingeniero agrícola), Universidad Agraria del Ecuador, Milagro, Ecuador.
- Chau, C., & Huang, Y. (2004). Characterization of passion fruit seed fibres—a potential fibre source. *Food Chemistry*, 85(2), 189-194.
- Carvas, J. M., Vukolic, A., Yepuri, G., Xiong, Y., Popp, K., Schmutz, I., ... & Yang, Z. (2012). Period2 gene mutant mice show compromised insulin-mediated endothelial nitric oxide release and altered glucose homeostasis. *Frontiers in physiology*, 3, 337.
- Chen, L., & Yang, G. (2014). PPARs integrate the mammalian clock and energy metabolism. *PPAR research*, 2014(1), 653017.
- Collins, S., Martin, T. L., Surwit, R. S., & Robidoux, J. (2004). Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the c57bl/6j mouse: Physiological and molecular characteristics. *Physiology Behavior*, 81(2), 243-248.
- Consejo, P. E. y. e. (2006). *Reglamento europeo no 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos*. Unión Europea Retrieved from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02006R1924-20141213&qid=1555409241335&from=EN>

- Cremonini, E., Bettaieb, A., Haj, F. G., Fraga, C. G., *et al.* (2016). (-)-epicatechin improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 599, 13-21.
- Cui, Y., Yin, Y., Li, S., Xie, Y., Wu, Z., Yang, H., ... & Li, X. (2022). Apple polyphenol extract targets circadian rhythms to improve liver biological clock and lipid homeostasis in C57BL/6 male mice with mistimed high-fat diet feeding. *Journal of Functional Foods*, 92, 105051.
- Daan, S., & Pittendrigh, C. S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents: III. Heavy water and constant light: Homeostasis of frequency?. *Journal of comparative physiology*, 106, 267-290.
- Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B., & Verbeke, K. (2019). The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(8), 461-478.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (orac– fluorescein) assay. *Journal of agricultural food chemistry*, 52(1), 48-54.
- De Araujo, Q. R., Gattward, J. N., Almoosawi, S., Silva, M., *et al.* (2016). Cocoa and human health: From head to foot--a review. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, 56(1), 1-12.
- De Assis, L. V. M., & Oster, H. (2021). The circadian clock and metabolic homeostasis: entangled networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(10), 4563-4587.
- de Barros, H. E. A., Natarelli, C. V. L., de Carvalho Tavares, I. M., de Oliveira, A. L. M., *et al.* (2020). Nutritional clustering of cookies developed with cocoa shell, soy, and green banana flours using exploratory methods. *Food and Bioprocess Technology*, 13(9), 1566-1578.
- Delgado-Ospina, Martuscelli, M., Grande-Tovar, C. D., Lucas-Gonzalez, R., *et al.* (2021a). Cacao pod husk flour as an ingredient for reformulating frankfurters: Effects on quality properties. *Foods*, 10(6).
- Delgado-Ospina, J., Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., *et al.* (2021b). Bioactive compounds and techno-functional properties of high-fiber co-products of the cacao agro-industrial chain. *Heliyon*, 7(4), e06799.
- Delgado-Ospina, J., Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. Á., Martuscelli, M., & Chaves-López, C. (2022). Potential of the cocoa shell to improve the quality properties of a burger-like meat product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(8), e16752.
- Dewi, S. R., Stevens, L. A., Pearson, A. E., Ferrari, R., *et al.* (2022). Investigating the role of solvent type and microwave selective heating on the extraction of phenolic compounds from cacao (theobroma cacao L.) pod husk. *Food and Bioproducts Processing*, 134, 210-222.
- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., *et al.* (2021). Polyphenols and human health: The role of bioavailability. *Nutrients*, 13(1), 273.
- Diano, S., Liu, Z. W., Jeong, J. K., Dietrich, M. O., Ruan, H. B., Kim, E., ... & Horvath, T. L. (2011). Peroxisome proliferation–associated control of reactive oxygens

- species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nature medicine*, 17(9), 1121-1127.
- Dietrich, M. O., Antunes, C., Geliang, G., Liu, Z. W., Borok, E., Nie, Y., ... & Horvath, T. L. (2010). AgRP neurons mediate Sirt1's action on the melanocortin system and energy balance: roles for Sirt1 in neuronal firing and synaptic plasticity. *Journal of Neuroscience*, 30(35), 11815-11825.
- Dollet, L., & Zierath, J. R. (2019). Interplay between diet, exercise and the molecular circadian clock in orchestrating metabolic adaptations of adipose tissue. *The Journal of physiology*, 597(6), 1439-1450.
- Domínguez-Hernández, E., Rangel-Hernández, J., Morales-Sánchez, E., & Gaytán-Martínez, M. (2022). Effect of Ohmic heating Nixtamalization on the structural and physicochemical characteristics of instant maize flours and their relation to starch modifications. *IECBM 2022*, 7.
- Dufoo-Hurtado, E., Wall-Medrano, A., & Campos-Vega, R. (2020). Naturally-derived chronobiotics in chrononutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 95, 173-182.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271-290.
- Dyar, K. A., Lutter, D., Artati, A., Ceglia, N. J., et al. (2018). Atlas of circadian metabolism reveals system-wide coordination and communication between clocks. *Cell*, 174(6), 1571-1585.e1511.
- Eckel-Mahan, K. L., Patel, V. R., De Mateo, S., Orozco-Solis, R., Ceglia, N. J., Sahar, S., ... & Sassone-Corsi, P. (2013). Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell*, 155(7), 1464-1478.
- El-Saied, H. M., Morsi, M. K., & Amer, M. M. A. (1981). Composition of cocoa shell fat as related to cocoa butter. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 20(2), 145-151.
- Englund, A., Kovanen, L., Saarikoski, S. T., Haukka, J., et al. (2009). Npas2 and per2 are linked to risk factors of the metabolic syndrome. *Journal of Circadian Rhythms*, 7(1), 1-9.
- Escalante-Covarrubias, Q., Mendoza-Viveros, L., González-Suárez, M., Sitten-Olea, R., et al. (2023). Time-of-day defines nad+ efficacy to treat diet-induced metabolic disease by synchronizing the hepatic clock in mice. *Nature communications*, 14(1), 1685.
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 55-71.
- Feregrino-Pérez, A. A., Berumen, L. C., García-Alcocer, G., Guevara-Gonzalez, R. n. G., et al. (2008). Composition and chemopreventive effect of polysaccharides from common beans (*phaseolus vulgaris* L.) on azoxymethane-induced colon cancer. *Journal of agricultural food chemistry*, 56(18), 8737-8744.
- Fernández-López, J., Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Sayas-Barberá, E., et al. (2018). Chia oil extraction coproduct as a potential new ingredient for the food industry: Chemical, physicochemical, techno-functional and antioxidant properties. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(2), 130-136.

- Fernández-Ochoa, Á., Cázares-Camacho, R., Borrás-Linares, I., Domínguez-Avila, J. A., et al. (2020). Evaluation of metabolic changes in liver and serum of streptozotocin-induced diabetic rats after mango diet supplementation. *Journal of Functional Foods*, 64, 103695.
- Fink, L. N., Costford, S. R., Lee, Y. S., Jensen, T. E., et al. (2014). Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans. *Obesity*, 22(3), 747-757.
- Froy, O., & Chapnik, N. (2007). Circadian oscillation of innate immunity components in mouse small intestine. *Molecular immunology*, 44(8), 1954-1960.
- Fukumoto, L., & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of agricultural food chemistry*, 48(8), 3597-3604.
- Garaulet, M., Corbalán, M., Madrid, J., Morales, E., et al. (2010). Clock gene is implicated in weight reduction in obese patients participating in a dietary programme based on the mediterranean diet. *International journal of obesity*, 34(3), 516-523.
- Garaulet, M., & Madrid, J. A. (2009). Chronobiology, genetics and metabolic syndrome. *Current opinion in lipidology*, 20(2), 127-134.
- Goh, G. H., Maloney, S. K., Mark, P. J., & Blache, D. (2019). Episodic ultradian events—ultradian rhythms. *Biology*, 8(1), 15.
- Goude, K. A., Adingra, K. M.-D., & Gbotognon, O. J. (2019). Biochemical characterization, nutritional and antioxidant potentials of cocoa placenta (theobroma cacao l.). *Annals Food Science and Technology*, 20(3), 11.
- Govindarajan, K., MacSharry, J., Casey, P. G., Shanahan, F., et al. (2016). Unconjugated bile acids influence expression of circadian genes: A potential mechanism for microbe-host crosstalk. *PloS one*, 11(12), e0167319.
- Greco, C. M., Koronowski, K. B., Smith, J. G., Shi, J., Kunderfranco, P., Carriero, R., ... & Sassone-Corsi, P. (2021). Integration of feeding behavior by the liver circadian clock reveals network dependency of metabolic rhythms. *Science Advances*, 7(39), eabi7828.
- Grillo, G., Boffa, L., Binello, A., Mantegna, S., et al. (2019). Cocoa bean shell waste valorisation; extraction from lab to pilot-scale cavitation reactors. *Food Research International*, 115, 200-208.
- Grimaldi, B., Bellet, M. M., Katada, S., Astarita, G., Hirayama, J., Amin, R. H., ... & Sassone-Corsi, P. (2010). PER2 controls lipid metabolism by direct regulation of PPAR γ . *Cell metabolism*, 12(5), 509-520.
- Gu, X., & Wang, X. (2021). An overview of recent analysis and detection of acetylcholine. *Analytical biochemistry*, 632, 114381.
- Guan, D., & Lazar, M. A. (2021). Interconnections between circadian clocks and metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 131(15).
- Guo, R., Zhao, B., Wang, Y., Wu, D., et al. (2018). Cichoric acid prevents free-fatty-acid-induced lipid metabolism disorders via regulating bmal1 in hepg2 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(37), 9667-9678.

- Hagihara, H., Horikawa, T., Nakamura, H. K., Umemori, J., Shoji, H., Kamitani, Y., & Miyakawa, T. (2016). Circadian gene circuitry predicts hyperactive behavior in a mood disorder mouse model. *Cell reports*, 14(12), 2784-2796.
- Han, S., Gao, H., Song, R., Zhang, W., Li, Y., & Zhang, J. (2021). Oat fiber modulates hepatic circadian clock via promoting gut microbiota-derived short chain fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(51), 15624-15635.
- Harfmann, B. D., Schroder, E. A., Kachman, M. T., Hodge, B. A., *et al.* (2016). Muscle-specific loss of *bmal1* leads to disrupted tissue glucose metabolism and systemic glucose homeostasis. *Skeletal muscle*, 6(1), 1-13.
- Harper, D. G., Stopa, E. G., Kuo-Leblanc, V., McKee, A. C., *et al.* (2008). Dorsomedial scn neuronal subpopulations subserve different functions in human dementia. *Brain*, 131(6), 1609-1617.
- He, M. Q., Wang, J. Y., Wang, Y., Sui, J., Zhang, M., Ding, X., ... & Shi, B. Y. (2020). High-fat diet-induced adipose tissue expansion occurs prior to insulin resistance in C57BL/6J mice. *Chronic diseases and translational medicine*, 6(3), 198-207.
- Helkar, P. B., Sahoo, A. K., & Patil, N. (2016). Review: Food industry by-products used as a functional food ingredients. *International journal of waste resources*, 6(3), 1-6.
- Hernández-García, J., Navas-Carrillo, D., & Orenes-Piñero, E. (2020). Alterations of circadian rhythms and their impact on obesity, metabolic syndrome and cardiovascular diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(6), 1038-1047.
- Hernández-González, T., González-Barrio, R., Escobar, C., Madrid, J. A., Periago, M. J., Collado, M. C., ... & Garaulet, M. (2021). Timing of chocolate intake affects hunger, substrate oxidation, and microbiota: A randomized controlled trial. *The FASEB Journal*, 35(7), e21649.
- Hernández-Hernández, C., Viera-Alcaide, I., Morales-Sillero, A. M., Fernández-Bolaños, J., *et al.* (2018). Bioactive compounds in mexican genotypes of cocoa cotyledon and husk. *Food Chemistry*, 240, 831-839.
- Herrera, M. D., Pérez-Ramírez, I. F., Reynoso-Camacho, R., Reveles-Torres, L. R., Servín-Palestina, M., Granados-López, A. J., ... & López, J. A. (2023). Chemometric Evaluation of RI-Induced Phytochemicals in *Phaseolus vulgaris* Seeds Indicate an Improvement on Liver Enzymes in Obese Rats. *Molecules*, 28(24), 7983.
- Hoogerwerf, W. A., Hellmich, H. L., Cornélissen, G., Halberg, F., Shahinian, V. B., Bostwick, J., ... & Cassone, V. M. (2007). Clock gene expression in the murine gastrointestinal tract: endogenous rhythmicity and effects of a feeding regimen. *Gastroenterology*, 133(4), 1250-1260.
- Hou, J. K., Abraham, B., & El-Serag, H. (2011). Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature. *Official journal of the American College of Gastroenterology*, 106(4), 563-573.
- Hsieh, M. C., Yang, S. C., Tseng, H. L., Hwang, L. L., *et al.* (2010). Abnormal expressions of circadian-clock and circadian clock-controlled genes in the

- livers and kidneys of long-term, high-fat-diet-treated mice. *International journal of obesity*, 34(2), 227-239.
- Hussain, M. M. (2014). Regulation of intestinal lipid absorption by clock genes. *Annual review of nutrition*, 34(1), 357-375.
- Igbayilola, Y. D., Grema, M. G., & Jibrin, S. (2024). Molecular docking assessment of cocoa bean flavonoid extract and its impact on lipase enzymes and blood markers in high-fat diet fed rats. *Food and Humanity*, 3, 100443.
- Ioniță-Mîndrican, C.-B., Ziani, K., Mititelu, M., Oprea, E., *et al.* (2022). Therapeutic benefits and dietary restrictions of fiber intake: A state of the art review. *Nutrients*, 14(13), 2641.
- Iova, O. M., Marin, G. E., Lazar, I., Stanescu, I., Dogaru, G., Nicula, C. A., & Bulboacă, A. E. (2023). Nitric oxide/nitric oxide synthase system in the pathogenesis of neurodegenerative disorders—An overview. *Antioxidants*, 12(3), 753.
- Irondi, E., D, O., S, L., A, B., *et al.* (2019). Comparative inhibitory effects of cocoa bean and cocoa pod husk extracts on enzymes associated with hyperuricemia and hypertension in vitro. *International Food Research Journal*, 26.
- Ishii, S., Kitazawa, H., Mori, T., Kirino, A., *et al.* (2019). Identification of the catechin uptake transporter responsible for intestinal absorption of epigallocatechin gallate in mice. *Scientific Reports*, 9(1), 11014.
- Jacobi, D., Liu, S., Burkewitz, K., Kory, N., *et al.* (2015). Hepatic bmal1 regulates rhythmic mitochondrial dynamics and promotes metabolic fitness. *Cell metabolism*, 22(4), 709-720.
- Jozinović, A., Panak Balentić, J., Ačkar, Đ., Babić, J., *et al.* (2019). Cocoa husk application in the enrichment of extruded snack products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(2), e13866.
- Karim, A., Azlan, A., A, I., Hashim, P., *et al.* (2014). Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 381.
- Kawai, M., Kinoshita, S., Yamazaki, M., Yamamoto, K., *et al.* (2019). Intestinal clock system regulates skeletal homeostasis. *JCI Insight*, 4(5).
- Klâvus, A., Kokla, M., Noerman, S., Koistinen, V. M., Tuomainen, M., Zarei, I., ... & Hanhineva, K. (2020). "Notame": workflow for non-targeted LC–MS metabolic profiling. *Metabolites*, 10(4), 135.
- Kohsaka, A., Laposky, A. D., Ramsey, K. M., Estrada, C., *et al.* (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell metabolism*, 6(5), 414-421.
- Koronowski, K. B., Kinouchi, K., Welz, P. S., Smith, J. G., Zinna, V. M., Shi, J., ... & Sassone-Corsi, P. (2019). Defining the independence of the liver circadian clock. *Cell*, 177(6), 1448-1462.
- Kruger, C., & Mann, S. (2003). Safety evaluation of functional ingredients. *Food chemical toxicology*, 41(6), 793-805.

- Laker, R., Garde, C., Camera, D., Smiles, W., *et al.* (2017). Transcriptomic and epigenetic responses to short-term nutrient-exercise stress in humans. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.
- Lateef, A., Oloke, J., Gueguim Kana, E., Oyeniyi, S., *et al.* (2008). Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: Enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 24(10), 2369-2374.
- LeGates, T. A., & Altimus, C. M. (2011). Measuring circadian and acute light responses in mice using wheel running activity. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (48), 2463.
- Lecumberri, E., Mateos, R., Izquierdo-Pulido, M., Rupérez, P., *et al.* (2007). Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (theobroma cacao L.). *Food Chemistry*, 104(3), 948-954.
- Leone, V., Gibbons, S. M., Martinez, K., Hutchison, A. L., *et al.* (2015). Effects of diurnal variation of gut microbes and high-fat feeding on host circadian clock function and metabolism. *Cell host & microbe*, 17(5), 681-689.
- Li, Y., Hao, Y., Fan, F., & Zhang, B. (2018). The role of microbiome in insomnia, circadian disturbance and depression. *Frontiers in psychiatry*, 9, 669.
- Liang, X., Bushman, F. D., & FitzGerald, G. A. (2015). Rhythmicity of the intestinal microbiota is regulated by gender and the host circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(33), 10479-10484.
- Liang, X., & FitzGerald, G. A. (2017). Timing the microbes: The circadian rhythm of the gut microbiome. *Journal of biological rhythms*, 32(6), 505-515.
- Liu, L., Jiang, G., Peng, Z., Li, Y., *et al.* (2017). The effect of high fat diet on daily rhythm of the core clock genes and muscle functional genes in the skeletal muscle of chinese soft-shelled turtle (*trionyx sinensis*). *Comparative Biochemistry Physiology Part B: Biochemistry Molecular Biology*, 213, 17-27.
- Liu, S., Chang, X., Yu, J., & Xu, W. (2020). *Cerasus humilis* cherry polyphenol reduces high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 mice by mitigating fat deposition, inflammation, and oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(15), 4424-4436.
- Luo, Z., Li, M., Yang, Q., Zhang, Y., Liu, F., Gong, L., ... & Wang, M. (2022). Ferulic acid prevents nonalcoholic fatty liver disease by promoting fatty acid oxidation and energy expenditure in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Nutrients*, 14(12), 2530.
- Maceyka, M., & Spiegel, S. (2014). Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature*, 510(7503), 58-67.
- Maejima, T., Tsuno, Y., Miyazaki, S., Tsuneoka, Y., Hasegawa, E., Islam, M. T., ... & Mieda, M. (2021). GABA from vasopressin neurons regulates the time at which suprachiasmatic nucleus molecular clocks enable circadian behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6), e2010168118.

- Marcheva, B., Ramsey, K. M., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., *et al.* (2010). Disruption of the clock components clock and bmal1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, 466(7306), 627-631.
- Mazier, W., Saucisse, N., Simon, V., Cannich, A., *et al.* (2019). Mtorc1 and cb1 receptor signaling regulate excitatory glutamatergic inputs onto the hypothalamic paraventricular nucleus in response to energy availability. *Molecular Metabolism*, 28, 151-159.
- Mazzoli, R., & Pessione, E. (2016). The neuro-endocrinological role of microbial glutamate and gaba signaling. *Frontiers in microbiology*, 7, 1934.
- McIntosh, B. E., Hogenesch, J. B., & Bradfield, C. A. (2010). Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annual review of physiology*, 72(1), 625-645.
- Mena, P., Bresciani, L., Brindani, N., Ludwig, I. A., Pereira-Caro, G., Angelino, D., ... & Del Rio, D. (2019). Phenyl-γ-valerolactones and phenylvaleric acids, the main colonic metabolites of flavan-3-ols: Synthesis, analysis, bioavailability, and bioactivity. *Natural product reports*, 36(5), 714-752.
- Mendoza-Zamorano, J. (2022). Efecto del procesamiento y fermentación de la vaina de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre sus características nutritivas, nutraceuticas y funcionales. (Maestro en ciencia y tecnología de alimentos), Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro. (290742)
- México, G. d. (2020, 14/07/2020). Del campo a tu paladar, el cacao, un cultivo tradicional. Recuperado de <https://www.gob.mx/fnd/es/articulos/del-campo-a-tu-paladar-el-cacao-un-cultivo-tradicional?idiom=es>
- México, G. d. (2021, 10/02/2021). El cacao, "alimento de los dioses". Recuperado de: <https://www.gob.mx/fnd/articulos/el-cacao-alimento-de-los-dioses?idiom=es>
- Mi, Y., Qi, G., Fan, R., Ji, X., Liu, Z., & Liu, X. (2017). EGCG ameliorates diet-induced metabolic syndrome associating with the circadian clock. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863(6), 1575-1589.
- Michielan, A., & D'Incà, R. (2015). Intestinal permeability in inflammatory bowel disease: Pathogenesis, clinical evaluation, and therapy of leaky gut. *Mediators of inflammation*, 2015.
- Miranda-Anaya, M., Bosques-Tistler, T., Ayala-García, I.N., Pérez-Mendoza, M., Carmona-Castro, A. (2021) Affections in photic and thermic circadian entrainment of the locomotor activity rhythm in obese volcano mouse *Neotomodon alstoni*. *Biological Rhythm Research*, 52(6), pp. 853–861
- Miranda, J., Portillo, M. P., Madrid, J. A., Arias, N., *et al.* (2013). Effects of resveratrol on changes induced by high-fat feeding on clock genes in rats. *British Journal of Nutrition*, 110(8), 1421-1428.
- Mitsui, S., Yamaguchi, S., Matsuo, T., Ishida, Y., *et al.* (2001). Antagonistic role of e4bp4 and par proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes & development*, 15(8), 995-1006.
- Mohawk, J. A., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neuroscience*, 35, 445-462.

- Morrison, Shaun F., Madden, Christopher J., & Tupone, D. (2014). Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell metabolism*, 19(5), 741-756.
- Müller-Maatsch, J., Bencivenni, M., Caligiani, A., Tedeschi, T., *et al.* (2016). Pectin content and composition from different food waste streams. *Food Chemistry*, 201, 37-45.
- Munkholm, P., Langholz, E., Hollander, D., Thornberg, K., *et al.* (1994). Intestinal permeability in patients with crohn's disease and ulcerative colitis and their first degree relatives. *Gut*, 35(1), 68-72.
- Murray, M., Dordevic, A. L., Ryan, L., & Bonham, M. P. (2019). A single-dose of a polyphenol-rich fucus vesiculosus extract is insufficient to blunt the elevated postprandial blood glucose responses exhibited by healthy adults in the evening: A randomised crossover trial. *Antioxidants*, 8(2), 49.
- Nakamura, T. J., Nakamura, W., Yamazaki, S., Kudo, T., *et al.* (2011). Age-related decline in circadian output. *The Journal of Neuroscience*, 31(28), 10201.
- Nenadis, N., Wang, L.-F., Tsimidou, M., & Zhang, H.-Y. (2004). Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the abts•+ assay. *Journal of agricultural food chemistry*, 52(15), 4669-4674.
- Nieto-Figueroa, K. H., Mendoza-García, N. V., Gaytán-Martínez, M., Wall-Medrano, A., *et al.* (2020). Effect of drying methods on the gastrointestinal fate and bioactivity of phytochemicals from cocoa pod husk: In vitro and in silico approaches. *Food Research International*, 137, 109725.
- Oddoye, E. O., Agyente-Badu, C. K., & Gyedu-Akoto, E. (2013). Cocoa and its by-products: Identification and utilization. *Chocolate in health and nutrition*, 23-37.
- Oishi, K., Yamamoto, S., Oike, H., Ohkura, N., *et al.* (2017). Cinnamic acid shortens the period of the circadian clock in mice. *Biochemistry and biophysics reports*, 9, 232-237.
- Okiyama, D. C., Navarro, S. L., Rodrigues, C. E. J. T. i. F. S., & Technology. (2017). Cocoa shell and its compounds: *Applications in the food industry*. 63, 103-112.
- Olivero-David, R., Ruiz-Roso, M. B., Caporaso, N., Perez-Olleros, L., *et al.* (2018). In vivo bioavailability of polyphenols from grape by-product extracts, and effect on lipemia of normocholesterolemic wistar rats. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 98(15), 5581-5590.
- Omotola, O., Legan, S., Slade, E., Adekunle, A., *et al.* (2019). Estradiol regulates daily rhythms underlying diet-induced obesity in female mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 317(6), E1172-E1181.
- Ono, D., Honma, K. I., & Honma, S. (2021). GABAergic mechanisms in the suprachiasmatic nucleus that influence circadian rhythm. *Journal of Neurochemistry*, 157(1), 31-41.
- Oomah, B. D., Cardador-Martínez, A., & Loarca-Piña, G. (2005). Phenolics and antioxidative activities in common beans (*phaseolus vulgaris* l). *Journal of the Science of Food Agriculture*, 85(6), 935-942.

- Oosterman, J. E., Wopereis, S., & Kalsbeek, A. (2020). The circadian clock, shift work, and tissue-specific insulin resistance. *Endocrinology*, 161(12), bqaa180.
- Ordóñez, Y. F., González, J., Bedia, C., Casas, J., Abad, J. L., Delgado, A., & Fabrias, G. (2016). 3-Ketosphinganine provokes the accumulation of dihydroshingolipids and induces autophagy in cancer cells. *Molecular BioSystems*, 12(4), 1166-1173.
- Oseguera-Castro, K. Y., Madrid, J. A., Martínez Madrid, M. J., García, O. P., *et al.* (2019). Antioxidant dietary fiber isolated from spent coffee (coffea arabica l.) grounds improves chronotype and circadian locomotor activity in young adults. *Food & Function*, 10(8), 4546-4556.
- Pácha, J., & Sumová, A. (2013). Circadian regulation of epithelial functions in the intestine. *Acta Physiologica*, 208(1), 11-24.
- Padilla, S. L., Perez, J. G., Ben-Hamo, M., Johnson, C. W., *et al.* (2019). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus orchestrate circadian rhythms and metabolism. *Current Biology*, 29(4), 592-604.e594.
- Palmisano, B. T., Stafford, J. M., & Pendergast, J. S. (2017). High-fat feeding does not disrupt daily rhythms in female mice because of protection by ovarian hormones. *Frontiers in endocrinology*, 8, 44.
- Pan, M.-H., Lai, C.-S., Wu, J.-C., & Ho, C.-T. (2013). Epigenetic and disease targets by polyphenols. *Current pharmaceutical design*, 19(34), 6156-6185.
- Pan, X., Bradfield, C. A., & Hussain, M. M. (2016). Global and hepatocyte-specific ablation of *bmal1* induces hyperlipidaemia and enhances atherosclerosis. *Nature communications*, 7(1), 13011.
- Pan, X., & Hussain, M. M. (2009). Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *Journal of Lipid Research*, 50(9), 1800-1813.
- Parkar, S. G., Kalsbeek, A., & Cheeseman, J. F. (2019). Potential role for the gut microbiota in modulating host circadian rhythms and metabolic health. *Microorganisms*, 7(2), 41.
- Paschos, G. K., Ibrahim, S., Song, W.-L., Kunieda, T., *et al.* (2012). Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component *arntl*. *Nature medicine*, 18(12), 1768-1777.
- Pendergast, J. S., Branecky, K. L., Yang, W., Ellacott, K. L., *et al.* (2013). High-fat diet acutely affects circadian organisation and eating behavior. *European Journal of Neuroscience*, 37(8), 1350-1356.
- Peris, M., Rubio-Arreaz, S., Castelló, M. L., & Ortolá, M. D. (2019). From the laboratory to the kitchen: New alternatives to healthier bakery products. *Foods*, 8(12).
- Petrenko, V., Gandasi, N. R., Sage, D., Tengholm, A., Barg, S., & Dibner, C. (2020). In pancreatic islets from type 2 diabetes patients, the dampened circadian oscillators lead to reduced insulin and glucagon exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(5), 2484-2495.
- Pivovarova, O., Jürchott, K., Rudovich, N., Hornemann, S., *et al.* (2015). Changes of dietary fat and carbohydrate content alter central and peripheral clock in

- humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(6), 2291-2302.
- Polachini, T. C., Norwood, E. A., Le-Bail, P., & Le-Bail, A. (2023). Clean-label techno-functional ingredients for baking products—a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(25), 7461-7476.
- Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Perez, L. A., Alvarez-Parrilla, E., ... & González-Aguilar, G. A. (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & function*, 5(6), 1063-1072.
- Rakshit, K., & Matveyenko, A. V. (2020). Induction of core circadian clock transcription factor *bmal1* enhances β -cell function and protects against obesity-induced glucose intolerance. *Diabetes*, 70(1), 143-154.
- Ramanathan, C., Xu, H., Khan, S. K., Shen, Y., *et al.* (2014). Cell type-specific functions of period genes revealed by novel adipocyte and hepatocyte circadian clock models. *PLoS genetics*, 10(4), e1004244.
- Rebollo-Hernanz, M., Cañas, S., Taladrid, D., Segovia, Á., *et al.* (2021). Extraction of phenolic compounds from cocoa shell: Modeling using response surface methodology and artificial neural networks. *Separation Purification Technology*, 118779.
- Redgwell, R., Trovato, V., Merinat, S., Curti, D., *et al.* (2003). Dietary fibre in cocoa shell: Characterisation of component polysaccharides. *Food Chemistry*, 81(1), 103-112.
- Ribas-Latre, A., Baselga-Escudero, L., Casanova, E., Arola-Arnal, A., *et al.* (2015a). Dietary proanthocyanidins modulate *bmal1* acetylation, *nampt* expression and *nad* levels in rat liver. *Scientific Reports*, 5(1), 1-13.
- Ribas-Latre, A., Baselga-Escudero, L., Casanova, E., Arola-Arnal, A., *et al.* (2015b). Chronic consumption of dietary proanthocyanidins modulates peripheral clocks in healthy and obese rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26(2), 112-119.
- Ribas-Latre, A., Del Bas, J. M., Baselga-Escudero, L., Casanova, E., *et al.* (2015c). Dietary proanthocyanidins modulate melatonin levels in plasma and the expression pattern of clock genes in the hypothalamus of rats. *Molecular nutrition & food research*, 59(5), 865-878.
- Rijo-Ferreira, F., & Takahashi, J. S. (2019). Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Medicine*, 11(1), 82.
- Rodríguez, R. M., de Assis, L. V. M., Calvo, E., Colom-Pellicer, M., Quesada-Vázquez, S., Cruz-Carrión, Á., ... & Mulero, M. (2024). Grape-Seed Proanthocyanidin Extract (GSPE) Modulates Diurnal Rhythms of Hepatic Metabolic Genes and Metabolites, and Reduces Lipid Deposition in Cafeteria-Fed Rats in a Time-of-Day-Dependent Manner. *Molecular Nutrition & Food Research*, 68(23), 2400554.
- Roenneberg, T., Allebrandt, K. V., Mellow, M., & Vetter, C. J. C. B. (2012). Social jetlag and obesity. 22(10), 939-943.

- Rohr, M. W., Narasimhulu, C. A., Rudeski-Rohr, T. A., & Parthasarathy, S. (2020). Negative effects of a high-fat diet on intestinal permeability: A review. *Advances in Nutrition*, 11(1), 77-91.
- Rojo-Poveda, O., Barbosa-Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *Nutrients*, 12(4), 1123.
- Rosen, E. D., Hsu, C. H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., & Spiegelman, B. M. (2002). C/EBP α induces adipogenesis through PPAR γ : a unified pathway. *Genes & development*, 16(1), 22-26.
- Ruan, W., Yuan, X., & Eltzschig, H. K. (2021). Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(4), 287-307.
- Rudic, R. D., McNamara, P., Curtis, A.-M., Boston, R. C., *et al.* (2004). Bmal1 and clock, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLOS Biology*, 2(11), e377.
- Ruesgas-Ramón, M., Suárez-Quiroz, M. L., González-Ríos, O., Baréa, B., *et al.* (2020). Biomolecules extraction from coffee and cocoa by- and co-products using deep eutectic solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 81-91.
- SAGARPA. (2017, 2017). Cacao mexicano. Recuperado de: <https://1bestlinks.net/X2ox4>
- Schmalle, V., & Lorentz, A. (2020). Role of the microbiota in circadian rhythms of the host. *Chronobiology international*, 37(3), 301-310.
- Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrland, T. S., ... & Pluskal, T. (2023). Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nature biotechnology*, 41(4), 447-449.
- Schneider, N., Hauser, J., Oliveira, M., Cazaubon, E., Mottaz, S. C., O'Neill, B. V., ... & Deoni, S. C. (2019). Sphingomyelin in brain and cognitive development: preliminary data. *Eneuro*, 6(4).
- Schroeder, A. M., & Colwell, C. S. (2013). How to fix a broken clock. *Trends in pharmacological sciences*, 34(11), 605-619.
- Ma, G., Du, H., Hu, Q., Yang, W., Pei, F., & Xiao, H. (2021). Health benefits of edible mushroom polysaccharides and associated gut microbiota regulation. *Critical reviews in food science and nutrition*, 62(24), 6646-6663.
- Shi, H., Wang, Q., Zheng, M., Hao, S., Lum, J. S., Chen, X., ... & Zheng, K. (2020). Supplement of microbiota-accessible carbohydrates prevents neuroinflammation and cognitive decline by improving the gut microbiota-brain axis in diet-induced obese mice. *Journal of neuroinflammation*, 17, 1-21.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sobamiwa, O., & Longe, O. G. (1994). Utilization of cocoa-pod pericarp fractions in broiler chick diets. *Animal Feed Science and Technology*, 47(3), 237-244.
- Soliz-Rueda, J. R., López-Fernández-Sobrino, R., Bravo, F. I., Aragonès, G., Suarez, M., & Muguerza, B. (2022). Grape seed proanthocyanidins mitigate

- the disturbances caused by an abrupt photoperiod change in healthy and obese rats. *Nutrients*, 14(9), 1834.
- Song, Y., Shen, H., Liu, T., Pan, B., De Alwis, S., Zhang, W., ... & Zhang, T. (2021). Effects of three different mannans on obesity and gut microbiota in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Food & Function*, 12(10), 4606-4620.
- Sookoian, S., Castaño, G., Gemma, C., Gianotti, T. F., et al. (2007). Common genetic variations in clock transcription factor are associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology: WJG*, 13(31), 4242.
- Spagnuolo, M. S., Iossa, S., & Cigliano, L. (2020). Sweet but bitter: Focus on fructose impact on brain function in rodent models. *Nutrients*, 13(1), 1.
- Stec, D. E., Gordon, D. M., Hipp, J. A., Hong, S., Mitchell, Z. L., Franco, N. R., ... & Hinds Jr, T. D. (2019). Loss of hepatic PPAR α promotes inflammation and serum hyperlipidemia in diet-induced obesity. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 317(5), R733-R745.
- Stokes, K., Cooke, A., Chang, H., Weaver, D. R., Breault, D. T., & Karpowicz, P. (2017). The circadian clock gene BMAL1 coordinates intestinal regeneration. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 4(1), 95-114.
- Sun, L., Wang, Y., Song, Y., Cheng, X.-R., et al. (2015). Resveratrol restores the circadian rhythmic disorder of lipid metabolism induced by high-fat diet in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 458(1), 86-91.
- Sutton, G. M., Perez-Tilve, D., Nogueiras, R., Fang, J., Kim, J. K., Cone, R. D., ... & Butler, A. A. (2008). The melanocortin-3 receptor is required for entrainment to meal intake. *Journal of Neuroscience*, 28(48), 12946-12955.
- Swaab, D. F., Fliers, E., & Partiman, T. S. (1985). The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain research*, 342(1), 37-44.
- Tahara, Y., & Shibata, S. (2014). Chrono-biology, chrono-pharmacology, and chrono-nutrition. *Journal of pharmacological sciences*, 124(3), 320-335.
- Tahara, Y., Yamazaki, M., Sukigara, H., Motohashi, H., et al. (2018). Gut microbiota-derived short chain fatty acids induce circadian clock entrainment in mouse peripheral tissue. *Scientific Reports*, 8(1), 1395.
- Tal, Y., Chapnik, N., & Froy, O. (2019). Non-obesogenic doses of fatty acids modulate the functionality of the circadian clock in the liver. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76, 1795-1806.
- Tanaka, E., Mitani, T., Nakashima, M., Yonemoto, E., Fujii, H., & Ashida, H. (2022). Theobromine enhances the conversion of white adipocytes into beige adipocytes in a PPAR γ activation-dependent manner. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 100, 108898.
- The Human Metabolome Database. (s.f.a). DG(15:0/0:0/18:4n3). Recuperado el 21 de mayo de 2025, de <https://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0056004>
- The Human Metabolome Database. (s.f.b). 4-Hydroxybutyric acid. Recuperado el 21 de mayo de 2025, de <https://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB0000710>

- Tomio, Y. (2018). New understanding of pectin as a bioactive dietary fiber. *Journal of Food Bioactives*, 3(0).
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., ... & Bass, J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308(5724), 1043-1045.
- Van der Spek, R., Fliers, E., La Fleur, S. E., & Kalsbeek, A. (2018). Daily gene expression rhythms in rat white adipose tissue do not differ between subcutaneous and intra-abdominal depots. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 206.
- Van Drunen, R., & Eckel-Mahan, K. (2021). Circadian rhythms of the hypothalamus: from function to physiology. *Clocks & sleep*, 3(1), 189-226.
- Vasquez, Z. S., de Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., et al. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 90, 72-83.
- Velásquez-Jiménez, D. (2020). *Efecto de extracto de pasta de aguacate cv 'hass' sobre conductas de saciedad y marcadores hormonales entéricos en un modelo murino*. (Master), Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC, Hermosillo, Sonora, México.
- Velásquez-Jiménez, D., Corella-Salazar, D. A., Zuñiga-Martínez, B. S., Domínguez-Avila, J. A., et al. (2021). Phenolic compounds that cross the blood–brain barrier exert positive health effects as central nervous system antioxidants. *Food & Function*, 12(21), 10356-10369.
- Velásquez-Jiménez, D., Luzardo-Ocampo, I., Gaytán-Martínez, M., & Campos-Vega, R. (2023). Design and characterization of a solid-state fermented cacao pods and husk-based functional ingredient to potentially modulate circadian rhythm-associated proteins. *Food Bioscience*, 103199.
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. O., Robles-Sánchez, M., ... & González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & function*, 5(2), 189-197.
- Villaseñor, V. M., Enriquez-Vara, J. N., Urías-Silva, J. E., & Mojica, L. (2021). Edible insects: Techno-functional properties food and feed applications and biological potential. *Food Reviews International*, 1-27.
- Villegas-Aguilar, M., de la Cádiz Gurrea, M., Herranz-López, M., Barrajon-Catalán, E., Arráez-Román, D., Fernández-Ochoa, Á., & Segura-Carretero, A. (2024). An untargeted metabolomics approach applied to the study of the bioavailability and metabolism of three different bioactive plant extracts in human blood samples. *Food & Function*, 15(18), 9176-9190.
- Voigt, R., Forsyth, C., Green, S., Engen, P., et al. (2016). Circadian rhythm and the gut microbiome. *International review of neurobiology*, 131, 193-205.
- Vong, W. C., Hua, X. Y., & Liu, S.-Q. (2018). Solid-state fermentation with rhizopus oligosporus and yarrowia lipolytica improved nutritional and flavour properties of okara. *LWT*, 90, 316-322.

- Vriesmann, L. C., de Mello Castanho Amboni, R. D., & de Oliveira Petkowicz, C. L. (2011). Cacao pod husks (theobroma cacao l.): Composition and hot-water-soluble pectins. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 1173-1181.
- Walker, W. H., Walton, J. C., DeVries, A. C., & Nelson, R. J. (2020). Circadian rhythm disruption and mental health. *Translational psychiatry*, 10(1), 28.
- Wang, W., Pan, Y., Zhou, H., Wang, L., Chen, X., Song, G., ... & Li, A. (2018). Ferulic acid suppresses obesity and obesity-related metabolic syndromes in high fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *Food and agricultural immunology*, 29(1), 1116-1125.
- Wang, C. Y., Wen, M. S., Wang, H. W., Hsieh, I. C., Li, Y., Liu, P. Y., ... & Liao, J. K. (2008). Increased vascular senescence and impaired endothelial progenitor cell function mediated by mutation of circadian gene *Per2*. *Circulation*, 118(21), 2166-2173.
- Woller, A., Duez, H., Staels, B., & Lefranc, M. (2016). A mathematical model of the liver circadian clock linking feeding and fasting cycles to clock function. *Cell reports*, 17(4), 1087-1097.
- Xia, J., & Wishart, D. S. (2016). Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Current Protocols in Bioinformatics*, 55(1), 14.10.1–14.10.91.
- Xiao, L., Sonne, S. B., Feng, Q., Chen, N., Xia, Z., Li, X., ... & Kristiansen, K. (2017). High-fat feeding rather than obesity drives taxonomical and functional changes in the gut microbiota in mice. *Microbiome*, 5, 1-12.
- Xu, H., Zhang, L., Kang, H., Liu, J., Zhang, J., Zhao, J., & Liu, S. (2021). Metabolomics identifies biomarker signatures to differentiate pancreatic cancer from type 2 diabetes mellitus in early diagnosis. *International journal of endocrinology*, 2021(1), 9990768.
- Xue, B., Xie, J., Huang, J., Chen, L., *et al.* (2016). Plant polyphenols alter a pathway of energy metabolism by inhibiting fecal bacteroidetes and firmicutes in vitro. *Food & Function*, 7(3), 1501-1507.
- Yang, S., Liu, A., Weidenhammer, A., Cooksey, R. C., McClain, D., Kim, M. K., ... & Chung, J. H. (2009). The role of *mPer2* clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms. *Endocrinology*, 150(5), 2153-2160.
- You, M., Wang, K., Pan, Y., Tao, L., Ma, Q., Zhang, G., & Hu, F. (2022). Combined royal jelly 10-hydroxydecanoic acid and aspirin has a synergistic effect against memory deficit and neuroinflammation. *Food & Function*, 13(4), 2336-2353.
- Yu, F., Zhang, T., Zhou, C., Xu, H., Guo, L., Chen, M., & Wu, B. (2019). The circadian clock gene *Bmal1* controls intestinal exporter MRP2 and drug disposition. *Theranostics*, 9(10), 2754.
- Yu, Q., Gao, F., & Ma, X. L. (2011). Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovascular research*, 89(3), 516-524.
- ZB, A. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*, 454, 846-851.
- Zemdeg, J., Quesseveur, G., Jarriault, D., Pénicaud, L., Fioramonti, X., & Guiard, B. P. (2016). High-fat diet-induced metabolic disorders impairs 5-HT function

- and anxiety-like behavior in mice. *British journal of pharmacology*, 173(13), 2095-2110.
- Zhang, Y., Cheng, L., Liu, Y., Zhang, R., Wu, Z., Cheng, K., & Zhang, X. (2022). Omics analyses of intestinal microbiota and hypothalamus clock genes in circadian disturbance model mice fed with green tea polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(6), 1890-1901.
- Zhang, W., Ho, C. T., Wei, W., Xiao, J., & Lu, M. (2024). Piperine regulates the circadian rhythms of hepatic clock gene expressions and gut microbiota in high-fat diet-induced obese rats. *Food Science and Human Wellness*, 13(3), 1617-1627.
- Zhao, M., Lu, D., Chen, M., & Wu, B. (2020). Introduction to mammalian circadian clock system. In *Circadian pharmacokinetics* (pp. 1-21): Springer.
- Zhao, Y. C., Zhou, M. M., Zhang, L. Y., Cong, P. X., Xu, J., Xue, C. H., ... & Wang, Y. M. (2020). Recovery of brain DHA-containing phosphatidylserine and ethanolamine plasmalogen after dietary DHA-enriched phosphatidylcholine and phosphatidylserine in SAMP8 mice fed with high-fat diet. *Lipids in Health and Disease*, 19, 1-12.
- Zvonic, S., Ptitsyn, A. A., Conrad, S. A., Scott, L. K., *et al.* (2006). Characterization of peripheral circadian clocks in adipose tissues. *Diabetes*, 55(4), 962-970.