

Estudio De Bioaccesibilidad De Antioxidantes Presentes Y Añadidos En Formulaciones De Chocolate Mediante Digestión Gastrointestinal *In Vitro*.

Sergio Andrés Suarez Diaz y Julián Eduardo Mejía Alquichire

Modalidad investigación

Director

Luis Javier López Giraldo

Ing. Químico, PhD. Química Bioquímica y ciencia de Alimentos

Codirector

Arley René Villamizar Jaimes

Químico, Mg. Ciencias y Tecnologías Ambientales

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ingenierías fisicoquímicas

Escuela de ingeniería química

Bucaramanga

2022

Tabla de contenido

Introducción	9
1. Objetivos	11
1.1. Objetivo General.....	11
1.2. Objetivos Específicos.....	11
2. Marco conceptual.....	12
2.1. Generalidades del cacao o del chocolate	12
2.2. Polifenoles y sus propiedades antioxidantes.....	13
2.3. Digestión gastrointestinal in vitro.....	14
2.4. Cuantificación y determinación de polifenoles.....	14
3. Estado del arte.....	16
4. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA	18
4.1. Preparación de extractos liofilizados de grano de cacao	18
4.2. Elaboración de las formulaciones de chocolate	18
4.3. Extracción de polifenoles de las muestras de chocolate	19
4.4. Digestión gástrica <i>in vitro</i>	19
4.4.1. Preparación de soluciones estándar	20
4.4.2. Fase bucal.....	20
4.4.3. Fase gástrica.....	20

4.4.4. Fase intestinal.....	21
4.4.5. Recolección de muestras.....	21
4.5. Cuantificación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu.....	21
4.6. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH.....	22
4.7. Identificación y cuantificación de polifenoles por HPLC.....	22
4.8. Determinación de la bioaccesibilidad	23
5. Análisis de resultados	24
5.1. Pruebas preliminares y verificación del balance de masa.....	24
5.2. Cuantificación de polifenoles totales por etapa	26
5.3. Bioaccesibilidad de los polifenoles calculada en la fase intestinal.....	29
5.4. Capacidad antirradicalaria por método DPPH.....	31
5.5. Caracterización de compuestos antioxidantes por el método HPLC	34
6. Conclusiones.....	39
7. Referencias bibliográficas.....	40

Lista de tablas

TABLA 1 CONTENIDO POLIFENÓLICO TEÓRICO DE LOS CHOCOLATES ENRIQUECIDOS	19
TABLA 2 BALANCES DE MASA	19
TABLA 3 COMPOSICIÓN DE SOLUCIONES ELECTROLÍTICAS	20
TABLA 4 CONTENIDO FENÓLICO MEDIANTE FOLIN-CIOCALTEU	24
TABLA 5 POLIFENOLES TOTALES OBTENIDOS EN LAS ADICIONES DE CHOCOLATE	25

Lista de figuras

FIGURA 1 CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES AL FINAL DE CADA ETAPA DIGESTIVA.....	26
FIGURA 2 POLIFENOLES TOTALES AL FINAL DE LA ETAPA INTESTINAL.....	28
FIGURA 3 BIOACCESIBILIDAD DE POLIFENOLES EN LAS MUESTRAS DE CHOCOLATE CALCULADA EN LA FASE INTESTINAL	29
FIGURA 4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE AL FINAL DE CADA ETAPA DIGESTIVA.....	32
FIGURA 5 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE VS POLIFENOLES TOTALES.....	33
FIGURA 6 CATEQUINA EN CADA ETAPA DIGESTIVA.....	34
FIGURA 7 EPICATEQUINA EN CADA ETAPA INTESTINAL.....	35
FIGURA 8 <i>PORCENTAJE DE CATEQUINA Y EPICATEQUINA EN FASE INTESTINAL</i>	37

Lista de apéndices

APÉNDICE A GRAFICA COMPARATIVA DE RESULTADOS OBTENIDOS CON BIBLIOGRAFÍA (CASTALDO ET AL., 2021)..	46
APÉNDICE B TABLA DE RESULTADOS ANOVA.....	46
APÉNDICE C RESULTADOS DE BIOACCESIBILIDAD EN CADA ETAPA DE DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	47

Resumen

Título: Estudio de bioaccesibilidad de antioxidantes presentes y añadidos en formulaciones de chocolate mediante digestión gastrointestinal *in vitro*.

Autores: Suarez Diaz, Sergio Andres, Mejía alquichire, Julián Eduardo**

Palabras clave: Cacao, Chocolate, Antioxidantes, Polifenoles, Bioaccesibilidad, Digestión gastro intestinal.

Descripción: El cacao se caracteriza por tener componentes de alto impacto biológico como los polifenoles, los cuales son antioxidantes naturales con efectos asociados con la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer y otras; sin embargo, gran parte de estos compuestos se pierden en el proceso de elaboración del chocolate y durante la digestión del mismo conforme pasa desde la boca hasta el intestino delgado en donde son absorbidos los nutrientes. Por esa razón es interesante analizar el comportamiento de los polifenoles, en un proceso digestivo *in vitro*, de chocolates enriquecidos con extractos ricos en este tipo de compuestos.

Por lo tanto, en este trabajo se estudió el efecto dosis respuesta que tiene la adición de extractos polifenólicos en una barra de chocolate, sobre la bioaccesibilidad y capacidad antioxidante. Para tal fin, se usó un modelo de digestión gastro intestinal *in vitro* siguiendo el protocolo estandarizado de Minekus. Se evaluaron las muestras de chocolate antes y durante la digestión gastrointestinal *in vitro*. Para la cuantificación de polifenoles totales se usó Folin-Ciocalteu, la capacidad antioxidante se determinó por DPPH; finalmente, se usó análisis HPLC para cuantificar los compuestos polifenólicos más importantes en el chocolate (catequina y epicatequina). Los resultados obtenidos de las pruebas mencionadas se analizaron usando ANOVA ($p < 0.05$).

Se observó que el aumento del contenido polifenólico favorece la bioaccesibilidad de los polifenoles, obteniendo valores de hasta 82,6% (incremento del 29% comparado con el chocolate sin enriquecer). Así mismo la capacidad antioxidante de los chocolates enriquecidos también aumentó después de la digestión, obteniendo un valor de 261,6[mgET/gms] (3 veces más, comparado con las muestras de chocolate sin adición de extracto). La cuantificación de catequina y epicatequina mostraron un aumento significativo al final de la digestión (6,5 y 2 veces más que el chocolate sin adición, respectivamente). Con base en lo anterior se concluye que la adición de extractos polifenólicos, en barras de chocolate, aumentan su bioaccesibilidad y las características antioxidantes de este tipo de alimento.

*Trabajo de grado

**Facultad de Ingeniería Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). Director: Luis Javier López Giraldo, Ingeniero Químico, Ph.D. Co-director: Arley Rene Villamizar Jaimes, Químico.

Abstract

Title: Bioaccessibility study of antioxidants present and added in chocolate formulations by in vitro gastrointestinal digestion.

Authors: Suarez Diaz, Sergio Andres, Mejía alquichire, Julián Eduardo**

Key Words: Cocoa, Chocolate, Antioxidans, Polifenols, Bioaccessibility, In vitro gastrointestinal digestion.

Description: Cocoa is characterized by having components of high biological impact such as polyphenols, which are natural antioxidants with effects associated with the prevention of cardiovascular diseases, cancer and others; however, most of these compounds are lost in the process of making chocolate and during its digestion as it passes from the mouth to the small intestine where the nutrients are absorbed. For this reason, it is interesting to analyze the behavior of polyphenols in an in vitro digestive process of chocolates enriched with extracts rich in these compounds.

Therefore, in this work we studied the dose-response effect of the addition of polyphenolic extracts in a chocolate bar on bioaccessibility and antioxidant capacity. For this purpose, an in vitro gastrointestinal digestion model was used following the standardized Minekus protocol. Chocolate samples were evaluated before and during in vitro gastrointestinal digestion. For the quantification of total polyphenols, Folin-Ciocalteu was used, antioxidant capacity was determined by DPPH; finally, HPLC analysis was used to quantify the most important polyphenolic compounds in chocolate (catechin and epicatechin). The results obtained from the above tests were analyzed using ANOVA ($p < 0.05$).

It was observed that the increase in polyphenolic content favors the bioaccessibility of the polyphenols, obtaining values of up to 82.6% (29% increase compared to chocolate without enrichment). Likewise, the antioxidant capacity of the enriched chocolates also increased after digestion, obtaining a value of 261.6 [mgET/gms] (3 times more, compared to chocolate samples without extract addition). The quantification of catechin and epicatechin showed a significant increase at the end of digestion (6.5 and 2 times more than chocolate without addition, respectively). Based on the above, it is concluded that the addition of polyphenolic extracts in chocolate bars increases their bioaccessibility and the antioxidant characteristics of this type of food.

*Degree work

**Facultad de Ingeniería Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA). Director: Luis Javier López Giraldo, Ingeniero Químico, Ph.D. Co-director: Arley Rene Villamizar Jaimes, Químico.

Introducción

El estilo de vida actual puede promover el consumo de alimentos de baja calidad y capacidad antioxidante, por lo tanto, es importante consumir productos que favorezcan la salud, reduciendo el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, varios tipos de cánceres y enfermedades neurodegenerativas; las cuales se pueden relacionar con el estrés oxidativo (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019). Los efectos nocivos del estrés oxidativo sobre la salud humana pueden ser reducidos mediante la ingesta de antioxidantes, presentes en diversos alimentos (Olivares et al., 2010; Sánchez-Valle V & Méndez-Sánchez N, 2013).

El chocolate es uno de los productos de más alto consumo a nivel mundial que aporta cantidades significativas de compuestos polifenólicos, reconocidos por sus propiedades antioxidantes (Murillo Mendez, 2019). Sin embargo, gran cantidad de estos antioxidantes se pierden en el proceso de elaboración, especialmente durante las etapas de tostado y estabilización, llegándose a reducir hasta un 61% en estas dos fases (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019), Publicaciones previas han demostrado que es posible extraer antioxidantes del grano de cacao (del Rio et al., 2013; Villamizar-Jaimes & López-Giraldo, 2017) y que estos se pueden adicionar durante el proceso de elaboración del chocolate de modo tal que se aumente la cantidad de compuestos polifenólicos y no se afecten sus atributos sensoriales (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019),

No obstante, a pesar de que la barra de chocolate sea rica en compuestos polifenólicos eso no es garantía que estos sean bioaccesibles, ya que la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos varía ampliamente. Algunos polifenoles tienen mala absorción y/o son inestables a las condiciones de pH propias del tracto gastrointestinal (del Rio et al., 2013). De hecho, los polifenoles del chocolate amargo están atrapados en una matriz sólida y solo los compuestos

liberados son potencialmente bioaccesibles y capaces de ejercer sus efectos beneficiosos en el cuerpo (Martini et al., 2018), por lo que es indispensable conocer la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos agregados. Teniendo esto en cuenta se desea conocer si la adición de extractos de cacao en una barra de chocolate aumenta la bioaccesibilidad y actividad antioxidante de los polifenoles presentes en este alimento enriquecido.

Para tal fin, se usó un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*, el cual es un modelo que simula la digestión gastrointestinal, con el fin de evaluar la bioaccesibilidad de los polifenoles presentes o añadidos a formulaciones de chocolate, el seguimiento se realizó a partir del contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y cuantificación por HPLC de los compuestos polifenólicos más importantes del chocolate.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

- Determinar si la adición de extracto polifenólico en una barra de chocolate aumenta su bioaccesibilidad después de un proceso de digestión *in vitro*.

1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la eficacia de la incorporación de los polifenoles, contenidos en los diferentes extractos, en la cobertura de chocolate.
- Identificar los cambios en la capacidad antioxidante de los chocolates enriquecidos con diferentes concentraciones de extracto polifenólico.
- Establecer los efectos que tiene la digestión *in vitro* sobre la bioaccesibilidad de polifenoles presentes en las formulaciones de chocolate enriquecido

2. Marco conceptual

2.1. Generalidades del cacao o del chocolate

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una especie originaria de los bosques húmedos de América del Sur, sus almendras constituyen el insumo básico para la industria del chocolate y sus derivados, la industria farmacéutica y la industria cosmética (Nazario et al., 2018). Colombia produce alrededor de 69 mil toneladas de cacao, la mayoría de éste se usa para chocolatería y bombonería. Santander es el productor más importante del país con una participación del 41 % de la producción nacional, cosechas que se realizan en su mayoría en los municipios de El Carmen y San Vicente de Chucurí, Rionegro, Lebrija y Landázuri (Fedecacao, 2022; Murillo Mendez, 2019), por lo que hay un gran potencial de desarrollo de nuevos negocios y productos de cacao con tendencia al crecimiento (Bautista, 2019).

El cacao posee numerosos componentes bioactivos como polifenoles, que son potentes antioxidantes benéficos para la salud humana; además también están presentes las metilxantinas y componentes precursores de aroma, en menor proporción (Murillo Mendez, 2019). Los factores que pueden afectar la cantidad y calidad de los polifenoles son las condiciones agroclimáticas, la variedad genotípica, las condiciones de fermentación y el proceso de manufactura (Iñiguez et al., 2021), los granos del cacao alcanzan a tener aproximadamente entre un 15-20% en peso seco de polifenoles (Perea-Villamil et al., 2009), por lo que son una fuente concentrada de este tipo de compuestos; la familia más representativa es la de los flavan-3-oles en donde destacan por su concentración, compuestos tales como la (+)-catequina y (-)-epicatequina (monómeros) y las procianidinas B1 y B2 (dímeros) (Pallares Pallares et al., 2017).

2.2. Polifenoles y sus propiedades antioxidantes

Los polifenoles se encuentran de forma abundante en el reino vegetal en especial en frutas y verduras (Hollman & Arts, 2000); se ha evidenciado que existe una relación directa entre el consumo de frutas y verduras (ricas en este tipo de compuestos) y la reducción en el padecimiento de enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, enfermedades autoinmunes, entre otras, debido a los antioxidantes naturales presentes, donde destacan los polifenoles (Tomás Barberán, 2003).

Los polifenoles tienen una estructura química que posee uno o más anillos aromáticos, y al menos un sustituyente hidroxilo (OH). Estos están divididos en dos grandes grupos, los ácidos fenólicos (benzoico y cinámicos) y los flavonoides (flavan-3-oles, antocianinas y taninos), donde los ácidos fenólicos tienen un solo anillo, mientras que los flavonoides tienen dos anillos fenólicos unidos por un anillo heterocíclico. Los polifenoles tienen gran actividad antioxidante debido a que poseen propiedades captadoras de radicales libres (Asenjo, 2016). Los radicales libres son moléculas muy reactivas que tienen un único electrón no apareado en su orbital externo, estos estados químicos se caracterizan por ser inestables, reaccionando con sustancias químicas orgánicas e inorgánicas. Para inhibir la reacción de los radicales libres con las células del cuerpo, es necesario tener sustancias que realicen funciones antioxidantes, cuyo trabajo es la de estabilizar las moléculas de radicales, entregándoles un electrón en la órbita exterior. Es por esto necesario investigar si los polifenoles presentes en los alimentos son bioaccesibles y biodisponibles en el cuerpo humano (Balde Balde, 2014; Barrientos, 2016; Paredes-López et al., 2010; Tenore et al., 2013).

2.3. Digestión gastrointestinal *in vitro*

La digestión gastrointestinal *in vitro* es un método que intenta imitar las condiciones fisiológicas *in vivo*, teniendo en cuenta la presencia de enzimas digestivas y sus concentraciones, el pH, el tiempo de digestión y las concentraciones de sal, entre otros factores (Minekus et al., 2014). Estos métodos son ampliamente utilizados para estudiar el comportamiento gastrointestinal de alimentos o fármacos, aunque los estudios *in vivo* siguen siendo los más confiables; los métodos *in vitro* tienen la ventaja de ser más rápidos, menos costosos, menos laboriosos y no tienen restricciones éticas, por lo que permiten medir un número grande de muestras, controlar variables, ser reproducibles, etc. (Minekus et al., 2014). Además, estudios sobre digestión de proteínas y péptidos, indican que los resultados entre los métodos *in vitro* y los *in vivo* presentan una buena comparabilidad, por lo que los métodos *in vitro* son muy adecuados para muchos enfoques como la digestión de proteínas (Egger et al., 2017). Debido a la necesidad de armonizar entre los diferentes estudios de digestión *in vitro*, expertos multidisciplinarios organizados de 35 países a través de INFOGEST publicaron un método estandarizado (Minekus et al., 2014), en el cual los parámetros fueron justificados y discutidos a gran detalle en relación con los datos fisiológicos *in vivo*, y desde su publicación este método ha sido citado alrededor de 650 veces en Web of Science y se ha utilizado ampliamente para numerosos propósitos (Brodkorb et al., 2019).

2.4. Cuantificación y determinación de polifenoles

Los polifenoles presentes en el chocolate y al final de la digestión pueden ser cuantificados por el método Folin-Ciocalteu, el cual sirve para cuantificar los polifenoles totales en la muestra (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019), pero al momento de determinar un compuesto específico, se suele utilizar un análisis por HPLC (Martini et al., 2018), mediciones que junto con

la digestión gástrica *in vitro* sirven para determinar la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes.

La bioaccesibilidad es la fracción de un elemento solubilizado durante la digestión gastrointestinal que se encuentra disponible para la absorción por el organismo (Torres-Escribano et al., 2011). Este factor se puede usar para determinar la cantidad de compuesto que alcanza el sitio en donde se lleva a cabo la absorción de un compuesto de interés que tenga características tóxicas o beneficiosas para la salud humana (Murillo Mendez, 2019).

En diversos estudios se han utilizado modelos estáticos de digestión gástricos *in vitro* para estudiar la bioaccesibilidad de una gran variedad de compuestos químicos o nutrientes (ácidos grasos, vitaminas, fenoles, metales, etc.) (Torres-Escribano et al., 2011). Si bien esta aproximación se ha usado para determinar la bioaccesibilidad de gran cantidad de compuestos, empieza a haber una tendencia del uso de esta técnica para estudiar la actividad antioxidante de compuestos bioactivos como los polifenoles tras la digestión (González, 2016). Estudios previos correlacionan linealmente la capacidad antioxidante con el contenido polifenólico; típicamente los análisis más usados para determinar esta capacidad antioxidante son DPPH, ABTS, ORAC y FRAP.

Además, investigaciones previas como las de Martini (Martini et al., 2018) estudiaron específicamente la bioaccesibilidad de polifenoles en chocolates enriquecidos, adquiridos en una tienda local de Italia, mediante modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* llegando a resultados menores a los encontrados en el presente estudio.

3. Estado del arte

El enriquecimiento de alimentos con sustancias potencialmente bioactivas como los polifenoles surge como un proceso alimentario que ofrece oportunidades de satisfacer la creciente demanda de productos más saludables (al Bittar et al., 2013). Zain *et al.* (Zain et al., 2018) concluyeron que al enriquecer pan con polifenoles extraídos de granos de café verdes podían incrementar las propiedades funcionales como la capacidad antioxidante del pan, gracias al aumento del contenido de polifenoles en comparación con las muestras de control y otros panes de origen comercial, pero esto resultó en una reducción de la aceptación de las propiedades organolépticas de manera general, especialmente para el olor y el sabor; este efecto es acorde a numerosas investigaciones realizadas en temas similares. Por ejemplo, Bergia (Bergia et al., 2016) concluyó que la incorporación de polifenoles en alimentos posterior a procesos térmicos no representa pérdidas significativas por lo que es una opción viable para el enriquecimiento.

En lo que respecta a la bioaccesibilidad de polifenoles de alimentos enriquecidos con ellos, muchos estudios se enfocan en analizar los resultados en la etapa final de la digestión, dejando a un lado el comportamiento de las fases oral y gástrica. Por ejemplo Castaldo (Castaldo et al., 2021) enriqueció galletas con un extracto polifenólico de posos de café gastado, observó que el contenido fenólico al final de la etapa colónica aumentó un 30% y la capacidad antioxidante 200%, en su estudio planteó que este aumento pudo deberse a que las melanoidinas forman complejos fibra-antioxidante que protegen los polifenoles, y que la microbiota intestinal fue capaz de liberar estos compuestos fenólicos por medio de una fermentación enzimática de esos complejos. Por otro lado, Solari-Godiño (Solari-Godiño et al., 2017) enriqueció picado de anchoa con fibra dietética de orujo de uva rica en polifenoles al 2%, 3% y 4% y encontró que a medida que aumentaba el contenido de la fibra dietética la bioaccesibilidad disminuía desde 53,9% a 29,65%, pero destacan la

importancia que pueden llegar a tener los metabolitos producidos a partir de la fermentación microbiana para llegar a liberar los polifenoles retenidos.

Referente a la bioaccesibilidad de polifenoles del cacao, Cantele (Cantele et al., 2020) encontró que la bioaccesibilidad de bebidas enriquecidas con extracto a base de cáscara de grano de cacao estuvo en un rango de 76 a 80%, pero afirman que esos resultados no están en línea con lo que se observa utilizando HPLC, por lo que se demuestra una vez más que el método Folin-Ciocalteu tiende a sobrestimar el contenido total de polifenoles; respecto a la capacidad antioxidante encontró pérdidas de aproximadamente un 40-42%, resultado que atribuyen a la degradación casi completa del ácido cafeico, el cual se reconoce como uno de los eliminadores más efectivos entre los ácidos fenólicos, seguido por el ácido protocatecúico, un ácido hidroxibenzoico con una actividad menor pero aún notable. Por su parte, Martini (Martini et al., 2018) encontró que, para tres chocolates amargos enriquecidos con extracto de té de sakura y de cúrcuma, la bioaccesibilidad al final de la digestión tuvo valores entre 40 y 68%, donde hablan de la buena estabilidad que tienen los compuestos polifenólicos del chocolate amargo a las condiciones intestinales, mientras que la actividad antioxidante tiene valores inferiores, entre un 8 y 20% respecto a la muestra de control.

4. DESCRIPCIÓN METODOLÓGICA

4.1. Preparación de extractos liofilizados de grano de cacao

Los granos secos de cacao CCN 51 se sometieron a un proceso de descascarillado, triturado en frío (-20 °C) y tamizado por malla N°40 (serie Tylor), luego se realizó una extracción tomando 10 g de grano tamizado y se mezcló con 1L de solución etano/agua (50/50 v/v) a una relación 1/100 p/v soluto/solvente, después se realizó un baño ultrasónico a 4°C durante 15 min, posterior a esto se calentó a 70 °C con agitación constante (pH:6) durante 30 min; para finalizar la mezcla se sometió a un proceso de centrifugado, se retiró el sobrenadante y se liofilizó durante 36 horas. Al final se obtuvo un extracto en polvo rico en polifenoles, al cual se le determinó el contenido total de polifenoles por la metodología Folin-Ciocalteu (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019).

4.2. Elaboración de las formulaciones de chocolate

Las coberturas de chocolate fueron adquiridas de la empresa Macoex SAS, estas fueron fabricadas a base de cacao proveniente de Santander y Catatumbo. Una vez se recibieron las coberturas, se realizaron las adiciones del extracto polifenólico siguiendo el proceso descrito por Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez (2019), en el que es necesario aumentar la temperatura de la barra de chocolate al momento de adicionar el extracto sin sobrepasar los 60 °C, para facilitar la homogenización de los añadidos, esto con el fin de obtener 3 diferentes concentraciones de polifenoles totales en el chocolate (tabla 1) teniendo en cuenta que el valor máximo y deseado para evitar la alteración del sabor es $27,952 \pm 0,664$ [mgEAG/gms] (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019). Se realizó un balance de masa (tabla 2) para determinar la cantidad de extracto liofilizado que se debía añadir para conseguir la concentración deseada. Adicional a esto, se realizaron ensayos a una cubierta proveniente de Catatumbo, esta fue tomada como referencia puesto que es un chocolate con mayor contenido de polifenoles.

Tabla 1

Contenido polifenólico teórico de los chocolates enriquecidos

Adición	Contenido fenólico teórico [mgEAG/gms]
A1	19,484
A2	23,718
A3	27,952

Tabla 2

Balances de masa

Ecuación	Modelo
$m_A = m_C + m_E$	Balance global
$m_A X_A = m_E X_E + m_C X_C$	Balance de polifenoles
$m_E = m_A (X_A - X_C) / (X_E - X_C)$	Masa de extracto liofilizado a adicionar

Donde m y X hacen referencia a la masa y composición; mientras que los subíndices A, C y E indican el chocolate enriquecido, el chocolate sin adición y el extracto liofilizado, respectivamente.

4.3. Extracción de polifenoles de las muestras de chocolate

El proceso de extracción se realizó siguiendo el método descrito por Toro Uribe (2018). Brevemente, se pesó 1 gramo de la muestra de chocolate; después, la extracción inició poniendo en contacto 20 mililitros de solución etanol/agua al 80% v/v durante 15 minutos a temperatura de 60 °C, ausencia de luz y agitación constante. Luego el medio de extracción fue centrifugado y filtrado para obtener el sobrenadante, el cual fue llevado a un recipiente para ser almacenado en frío. El proceso que se acabó de describir se realizó por triplicado para cada tipo de chocolate.

4.4. Digestión gástrica *in vitro*

La digestión gástrica *in vitro* se desarrolló siguiendo el procedimiento descrito por Murillo Mendez, (2019), el cual se basó en la metodología propuesta por Minekus et al., (2014) con algunas modificaciones como el cambio en la composición de una solución electrolítica reemplazando

(NH₄)₂CO₃ por (NH₄)Cl y la concentración de HCl, logrando un mejor control de pH durante la digestión, a continuación, se describen los pasos que se siguieron.

4.4.1. Preparación de soluciones estándar

Se prepararon soluciones estándar electrolíticas, las cuales simulan los fluidos de las 3 fases digestivas, fase bucal (SSF), gástrica (SGF) e intestinal (SIF) (ver tabla 3) durante todo el proceso de digestión (Minekus et al., 2014; Murillo Mendez, 2019).

Tabla 3

Composición de soluciones electrolíticas

Constituyentes	Concentración en solución de fluido salival (SSF), mL	Concentración en solución de fluido gástrico (SGF), mL	Concentración en solución de fluido intestinal (SIF), mL
	pH 7	pH 3	pH 7
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25	85
NaCl	-	47,2	38,4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,1	0,33
(NH ₄)Cl	0,06	0,5	-

4.4.2. Fase bucal

En la fase bucal se mezclaron 5g de muestra con 3,5mL de SSF y se añadieron 0,5mL de solución enzimática de α -amilasa (disuelta en SSF) a 1500U/mL, 25 μ L de CaCl₂ y 0,975mL de agua; la mezcla se mantuvo en agitación constante a una temperatura de 37 °C y con un pH de 7 por 5 minutos (Martini et al., 2018; Minekus et al., 2014; Murillo Mendez, 2019)

4.4.3. Fase gástrica

Para la fase gástrica se mezclaron, el resultante de la fase bucal junto con 7,5mL de SGF y se añadieron 1,6mL de solución enzimática de pepsina porcina (disuelta en SGF) a 25000U/mL, 5 μ L de CaCl₂ 0,3M, 0,2mL de HCl 1M, 0,695ml de agua. Se mantuvo a agitación constante

durante 2 horas mientras se controló el pH entre 2,9 y 3,1 y la temperatura entre 36 y 37°C (Minekus et al., 2014; Murillo Mendez, 2019)

4.4.4. Fase intestinal

Para la fase intestinal, se mezcló de solución resultante de la fase anterior con 11 mL de SIF, luego se adicionaron 5 mL de solución enzimática de pancreatina (disuelta en SIF), 2,5 mL de bilis al 0,5%, 40 µL de CaCl₂ 0,3M, 0,8 mL de NaOH 1M y 0,3 mL de agua. El tiempo de digestión intestinal fue de 2 horas a agitación constante (4500 rpm). Nuevamente, se controló el pH entre 6,9 y 7,1 y la temperatura entre 36 y 37 °C (Minekus et al., 2014; Murillo Mendez, 2019).

Para cada una de las fases de la digestión se monitorearon y controlaron el pH y la temperatura, con la ayuda de un titulador automático; para el control del pH se usaron NaOH a 1M y HCl a 6M con el fin de mantener el pH dentro los valores establecidos para cada fase (Minekus et al., 2014).

4.4.5. Recolección de muestras

Después de cada fase de digestión *in vitro* (boca, gástrica e intestinal), se recogió una muestra de 1 mL para cada una. Estas muestras fueron enfriadas inmediatamente en hielo, centrifugadas a 10000g por 20 minutos, para precipitar los materiales insolubles; mientras que el sobrenadante se filtró y se almacenó a -20 °C hasta que se desarrollaron los análisis posteriores (contenido de polifenoles totales, capacidad antioxidante y análisis por HPLC). Todos los experimentos se realizaron por triplicado (Martini et al., 2018).

4.5. Cuantificación de polifenoles totales por Folin-Ciocalteu

Se siguió el método descrito por Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez (2019). Brevemente, se mezclaron 50 µL de las muestras recolectadas (sobrenadantes de cada una de las fases de la digestión *in vitro*) junto con 1,5 mL de solución Folin-Ciocalteu:agua (10:100); luego se agitó

durante 15 segundos en vortex a 1500 rpm y se dejó en reposo y oscuridad durante 5 min, posteriormente se agregó 1,5mL de carbonato de sodio (7,5/100 p/v) y se agitó en vortex por 15 segundos, las muestras se dejaron en oscuridad durante 1 hora. Finalmente, se midió la absorbancia a 765nm en un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Spectronic), se calculó la concentración usando una curva de calibración de ácido gálico y los resultados se expresaron en miliequivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca [$mgEAG/gms$].

4.6. Determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

Para determinar la capacidad antirradicalaria se siguió el método descrito por (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019). Brevemente, se mezclaron 100 μ L de la muestra recolectada (sobrenadantes de cada una de las fases de la digestión *in vitro*) con 3,9mL de reactivo DPPH (60 μ M); luego se dejó reposar en ausencia de luz durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó una lectura de absorbancia a 517nm en un espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Spectronic). La capacidad antirradicalaria se calculó con la curva de calibración Trolox y los resultados se expresaron en miligramo equivalente de Trolox por gramo de muestra seca [$mgET/gms$].

4.7. Identificación y cuantificación de polifenoles por HPLC

La separación cromatográfica se desarrolló siguiendo la metodología desarrollada en el grupo de investigación CICTA en un HPLC ultimate 3000, equipado con un sistema de auto inyección y detector UV-VIS, columna en fase reversa analítica (Zorbax Eclipse XDB 150mm X 2.1mm) con tamaño de partícula de 5 μ m, a 25°C. Todos los compuestos se detectaron a una longitud de onda de 273nm. La fase móvil fue agua/ácido acético (99.7/0.3 v/v) (solvente A) y metanol (Solvente B), flujo de 0,5mL/min. El gradiente fue el siguiente: 0-10 min, 15% lineal de B; 10,1-18 min, 25% lineal de B; 18,1-25 min, 30% lineal de B; 25,1-30 min, 100% lineal de B; 30,1-35 min, 0 % lineal de B, seguido de 5 min de re-equilibrio de la columna antes de una nueva

inyección con un volumen de inyección de $5\mu L$. Todos los analitos fueron identificados y cuantificados por el método de estándar externo usando curvas de calibración de las sustancias patrón (catequina, epicatequina) (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019).

4.8. Determinación de la bioaccesibilidad

Para identificar la bioaccesibilidad de los compuestos polifenólicos se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%bioaccesibilidad = \frac{cantidad\ digerida}{cantidad\ extraida} * 100\% \quad (Ec. 1)$$

Donde “Cantidad extraída” corresponde a la cantidad total de polifenoles totales en el chocolate antes del proceso de digestión *in vitro* y “Cantidad digerida” corresponde al contenido de polifenoles totales presentes en las muestras analizadas al final de cada fase del proceso de digestión *in vitro* (Barrientos, 2016).

5. Análisis de resultados

5.1. Pruebas preliminares y verificación del balance de masa

Se realizó un análisis de polifenoles totales para las muestras de chocolate de Santander y Catatumbo (tabla 4). Se utilizó el chocolate de Catatumbo como muestra de comparación con los resultados obtenidos de bioaccesibilidad de los chocolates enriquecidos, debido a que el chocolate de Catatumbo contiene una cantidad natural de polifenoles totales, mayor a la que tiene el chocolate de Santander, y así comprobar si la adición de extracto liofilizado genera diferencia en el comportamiento del perfil polifenólico durante la digestión *in vitro*.

Tabla 4

Contenido fenólico mediante Folin-Ciocalteu

Muestra	Contenido fenólico [<i>mgEAG/gms</i>]
San	15,25
Cat	24,53
Extracto	280,88

San: chocolate de Santander; **Cat:** chocolate de Catatumbo; **Extracto:** Extracto liofilizado de cacao

Se usó el balance de masa presentado en la (tabla 2) para llegar a las concentraciones propuestas utilizando las muestras de la tabla 4. En la tabla 5 se observan los valores experimentales obtenidos junto con el porcentaje de error presentado en cada adición.

Tabla 5

Polifenoles totales obtenidos en las adiciones de polifenoles a chocolate de Santander

Adición	Contenido fenólico teórico [mgEAG/gms]	Extracto liofilizado agregado [g]	Contenido fenólico experimental [mgEAG/gms]	APE %
A1	19,484	0,810	20,78	6,644
A2	23,718	1,646	24,22	2,102
A3	27,952	2,511	27,30	2,333
MAPE				3,693

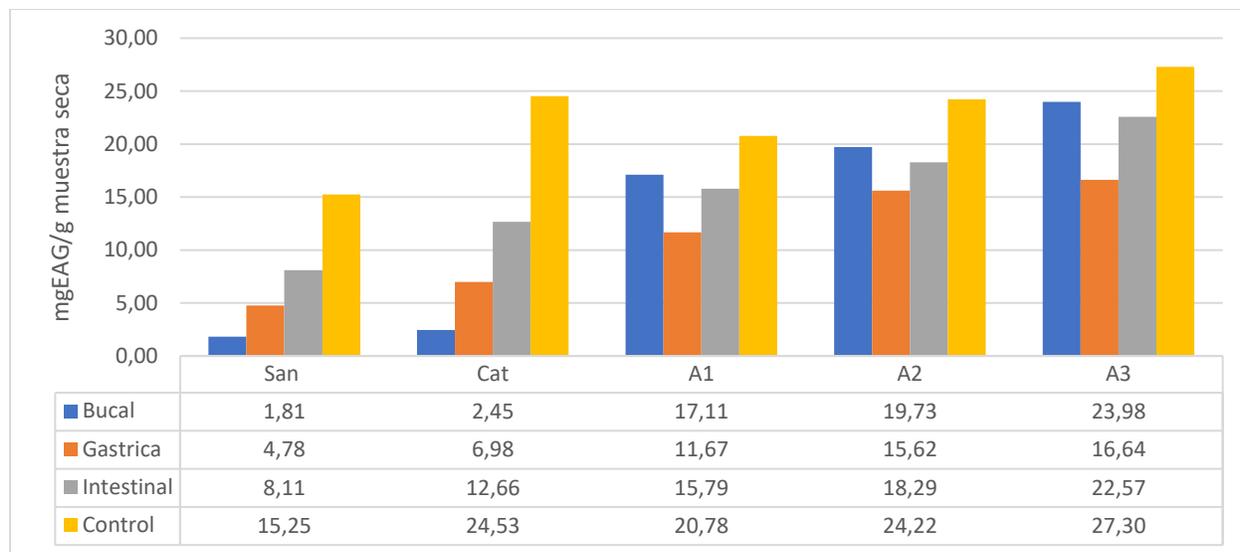
PTT: polifenoles totales teóricos; **PTE:** polifenoles totales experimentales; **APE:** Error porcentual absoluto; **MAPE:** error porcentual absoluto medio.

Se observa que el contenido de polifenoles totales en las adiciones tiene un error porcentual medio absoluto (MAPE) de 3,693%. Este error o diferencia entre los valores predichos (balance de masa) y los calculados experimentalmente puede explicarse si se tiene presente que durante el enriquecimiento fue necesario calentar la muestra, por lo que es posible que parte de los polifenoles adicionados hayan sufrido una desnaturalización térmica, y por tanto no hayan sido cuantificados por el método de Folin-Ciocalteu (Cienfuegos-Jovellanos Fernández, 2016). Además, también es posible que estén cuantificando otros compuestos reductores (como melanoidinas) y productos de la reacción de Maillard los cuales son cuantificables por el método Folin-Ciocalteu tal como lo mencionan varios autores (Martini et al., 2018; Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019).

5.2. Cuantificación de polifenoles totales por etapa

Figura 1

Cuantificación de polifenoles totales durante cada etapa digestiva



San: chocolate de Santander **Cat:** chocolate de Catatumbo **A1:** Adición 1 **A2:** Adición 2 **A3:** adición 3

En la figura 1 se observan los resultados, de las concentraciones en mgEAG/gms, obtenidos de polifenoles totales para cada etapa de digestión *in vitro* para chocolate enriquecido y sin enriquecer con extracto polifenólico. Se tienen resultados de Santander y Catatumbo al final de la etapa intestinal de 8,11 y 12,26 [mgEAG/gms] de polifenoles totales, muy similares a lo presentado por Marti (Martini et al., 2018) donde al final de la digestión se presentaron valores de 17 [mgEAG/gms] de polifenoles totales para chocolate amargo. Para los chocolates sin enriquecer, se evidencia un incremento progresivo en la cantidad de polifenoles liberados conforme se avanza en las etapas de digestión *in vitro*. Por otro lado, los resultados obtenidos para los chocolates enriquecidos con los extractos polifenólicos no siguen la misma tendencia, muestran un comportamiento similar al observado por Castaldo (Apéndice A (Castaldo et al., 2021) en galletas enriquecidas con fondos de café gastado. Por ejemplo, se evidenció que en la fase bucal

hay una liberación (*de hasta 23,98[mgEAG/gms]*) mucho mayor a la obtenida para las fases gástrica (16,64[mgEAG/gms]) e intestinal (22,57[mgEAG/gms]), tendencia que se mantiene para todas las adiciones que se realizaron. Además, en todos los casos en los que se realizó adición de polifenoles, la liberación de éstos fue mucho mayor en la fase bucal que la obtenida para los chocolates sin adición. Estas tendencias de liberación marcada en la fase bucal, de chocolates enriquecidos con extractos polifenólicos, pueden explicarse si se considera que el chocolate amargo posee una estructura agregada, es decir, con una distancia mínima entre partículas y con menos espacios abiertos entre ellas, que además están llenos de grasas (Paz-Yépez et al., 2019), lo que eventualmente puede impedir que los extractos polifenólicos se incorporen efectivamente en la matriz, quedando así en las partes más superficiales de ésta, dando como resultado una liberación masiva de los polifenoles que no alcanzaron a unirse con la matriz de chocolate.

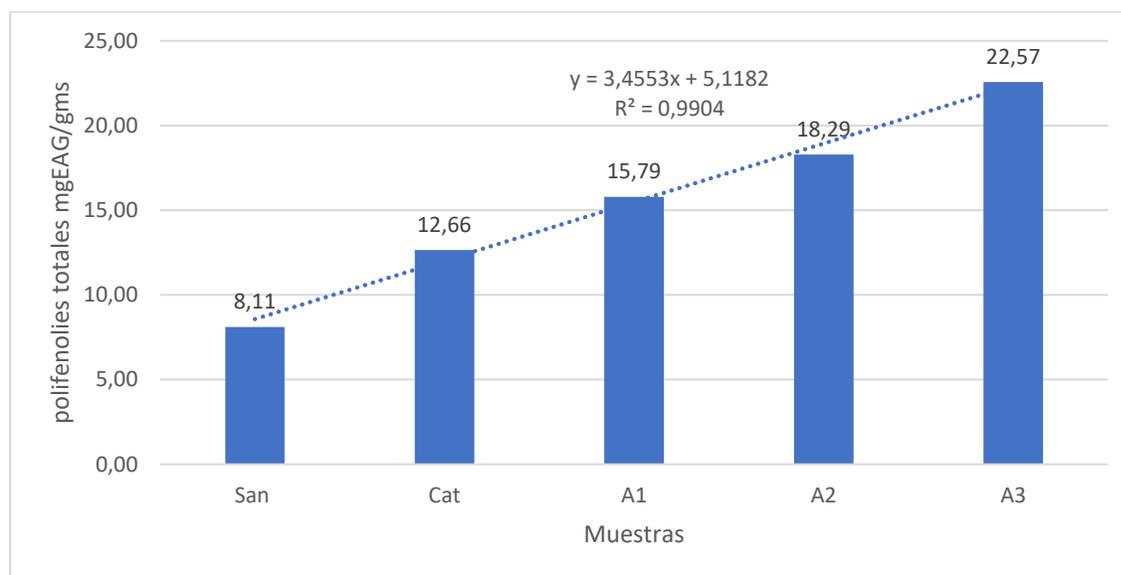
Por otra parte, pese a que la acidez tiene un efecto protector sobre los polifenoles (Busso Casati, 2016), en la etapa gástrica, para las adiciones, se observa como el contenido de estos disminuye, esto puede ser consecuencia de la formación de agregados insolubles entre los polifenoles de alto peso molecular como las proantocianidinas y la α -amilasa (Pineda-Vadillo et al., 2016), y la formación de gotas emulsionadas de grasa que incorporan a los polifenoles en la fase lipídica (Paz-Yépez et al., 2019) y los protegen, además de esto, este comportamiento está acorde con estudios donde en matrices alimentarias líquidas, los polifenoles son liberados casi en su totalidad en la etapa oral y en la etapa digestiva estos experimentan una caída en contenido de polifenoles totales a medida que transcurre la digestión (Asenjo, 2016; Pineda-Vadillo et al., 2016).

Respecto a la etapa intestinal (figura 2) se observa un aumento en el contenido de polifenoles, lo cual es un comportamiento que concuerda con el incremento observado por Martini et al., (2018), esto puede estar relacionado a diferentes factores como la naturaleza de la matriz del

chocolate, así como el tiempo de exposición a las condiciones intestinales y la acción enzimática de la pancreatina. Por otro lado, el pH intestinal y la concentración de bilis no tiene un efecto significativo sobre la degradación de la matriz alimentaria (Paz-Yépez et al., 2019), de lo que se podría pensar que directamente esas variables no influyen significativamente en la liberación de polifenoles.

Figura 2

Cantidad de polifenoles totales bioaccesibles al final de la digestión in vitro



San: chocolate de Santander **Cat:** chocolate de Catatumbo **A1:** Adición 1 **A2:** Adición 2 **A3:** adición 3

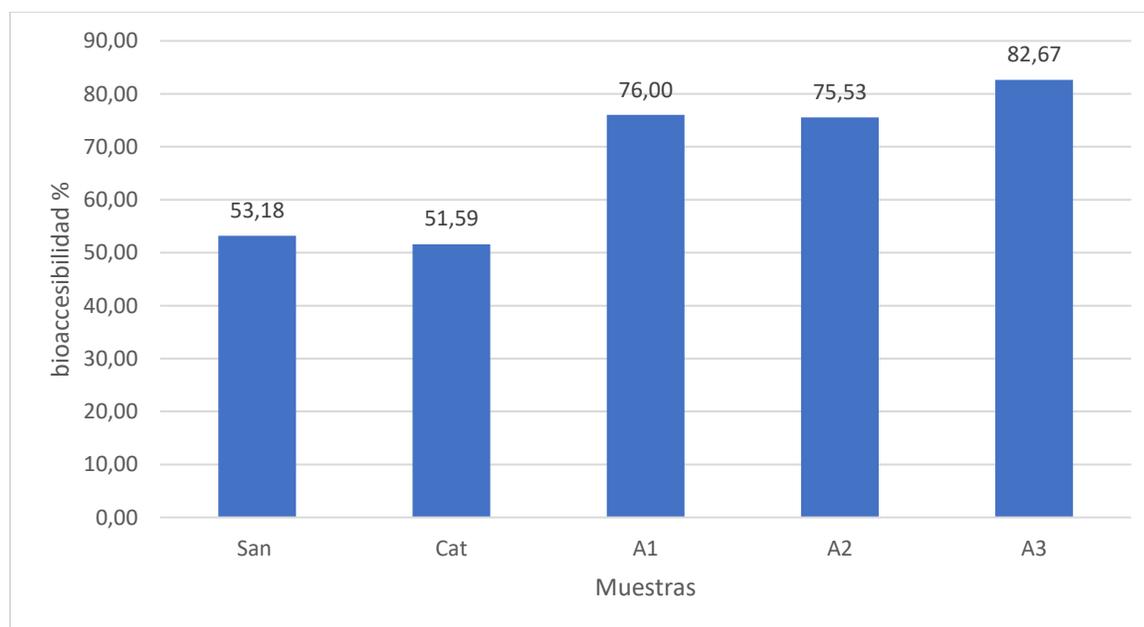
Por otra parte, cuando se comparan los chocolates sin adición con los chocolates con adición, en todos los casos se observa (Figura 1) que la adición del extracto aumentó significativamente ($p < 0,05$ Apéndice B) el contenido de polifenoles bioaccesibles en todas las fases de la digestión *in vitro*; incluyendo la fase intestinal (Figura 2) que es donde ocurrirá la absorción de los mismos. Incluso, en la figura 2 se observa un incremento lineal entre las muestras y la concentración de polifenoles, con un valor mínimo para la muestra de Santander de 8,11[mgEAG/gms] contra 22,57[mgEAG/gms] para A3, un valor de más del doble a la

inicial; con este resultado, se concluye que el enriquecimiento de este tipo de matrices aumenta la probabilidad de que este tipo de alimentos tengan un mayor potencial de efecto benéfico sobre la salud de quien los consume. Sin embargo, el hecho de que aumente el contenido de polifenoles totales en la fase intestinal, que es la fase en la que comienza la absorción de los polifenoles (Perez-Perez et al., 2018), no garantiza su aprovechamiento; por eso es necesario evaluar la capacidad antioxidante, la cual puede considerarse como una medida indirecta del potencial que tiene este tipo sustancias para prevenir el estrés oxidativo de las células y así de obtener un efecto beneficioso sobre la salud de las personas que los consumen. Bien entendido, para probar el efecto sobre un organismo vivo se deben hacer pruebas *in vivo* o *ex vivo*, las cuales no hacen parte del alcance de este trabajo.

5.3. Bioaccesibilidad de los polifenoles calculada en la fase intestinal

Figura 3

Bioaccesibilidad de polifenoles en las muestras de chocolate calculada en la fase intestinal



San: chocolate de Santander **Cat:** chocolate de Catatumbo **A1:** Adición 1 **A2:** Adición 2 **A3:** adición 3

En la figura 3 y apéndice C se pueden observar los resultados de bioaccesibilidad de cada muestra; así, por ejemplo, para Santander y Catatumbo se aprecian valores muy similares (53,18% y 51,59% respectivamente), pese a que los contenidos iniciales de polifenoles en ambas muestras eran de 15,25[mgEAG/gms] para Santander y de 24,53[mgEAG/gms] para Catatumbo. Por otro lado, los resultados de los chocolates enriquecidos con el extracto presentaron un incremento significativo en la bioaccesibilidad ($p < 0,05$ Apéndice B), alcanzando valores de hasta un 82,67%, lo que representa un aumento del 29,49% cuando se compara con la muestra sin adición y un 14,22% comparado con valores máximos encontrados por Martini (Martini et al., 2018). Estos resultados indican que el valor del contenido inicial de polifenoles en las muestras sin adición no tiene relación con la distribución y liberación porcentual de los mismos, lo cual se puede explicar si se considera que los polifenoles en estas muestras se encuentran inmersos en la matriz de chocolate (sólidos, grasa y azúcares). Mientras que, en las muestras enriquecidas con polifenoles, el incremento presentado podría deberse a que los polifenoles añadidos estuvieron inicialmente en la superficie del chocolate, luego fueron encapsulados naturalmente en micelas o vesículas grasas y finalmente liberados en la etapa intestinal (Paz-Yépez et al., 2019).

Por otro lado, se observa que el incremento de la bioaccesibilidad entre las adiciones A1 y A3 es de apenas 6,67%, un valor bastante reducido cuando se compara con el aumento de 29,49% entre la muestra San y la muestra A1. Ahora bien, este hecho puede resultar ventajoso puesto que indica que no es necesario realizar una adición grande para obtener un incremento significativo de la bioaccesibilidad, especialmente teniendo en cuenta que la adición de extractos ricos en polifenoles totales, tiene un efecto negativo sobre las características sensoriales del chocolate (Vázquez Ovando et al., 2016); en relación con eso Quiroga y Herrera (Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019) mencionaron en su trabajo que adiciones de este tipo

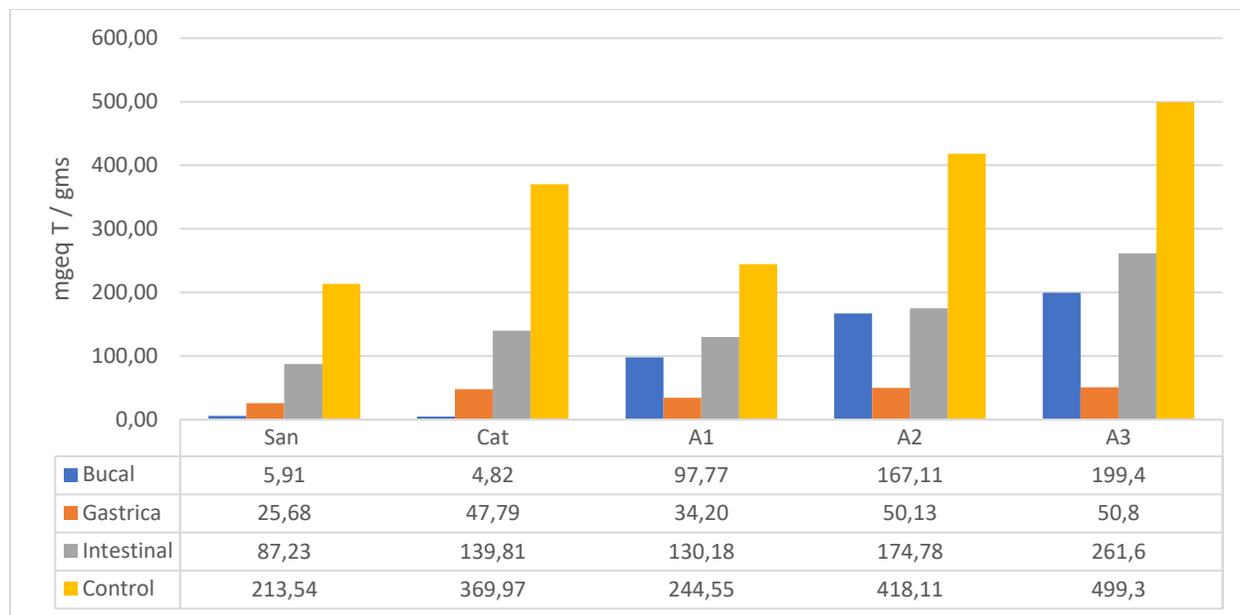
de extractos por encima de 27,952 mgEAG/gms se relacionan con un incremento de astringencia, lo que limita su aceptación por los consumidores. Teniendo en cuenta lo anterior, la adición A1 (20,78 [mgEAG/gms]) es suficiente para conseguir que un porcentaje alto (76%) de polifenoles lleguen al sitio en donde ocurre su proceso de absorción, sin que exista una disminución notoria en las características sensoriales del chocolate y ahorrando costos asociados con el enriquecimiento de la matriz.

5.4. Capacidad antirradicalaria por método DPPH

Los resultados obtenidos presentan un comportamiento muy similar al de polifenoles totales; en la figura 4 se observa como la capacidad antirradicalaria es mayor en la fase bucal en comparación con la fase gástrica, comportamiento similar al obtenido por Castaldo (Castaldo et al., 2021) que a su vez incrementa en la etapa intestinal y en ninguno de los casos supera al valor de referencia, es decir, el valor de capacidad antirradicalaria de los chocolates con y sin enriquecimiento antes del proceso de digestión *in vitro*. Este comportamiento concuerda con la literatura, en donde se ha evidenciado que la capacidad antirradicalaria presenta una relación directamente proporcional con el contenido de polifenoles. Lo cual indica que los polifenoles presentes en las muestras son los responsables de atrapar el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Martini et al., 2018; Quiroga Ruiz & Herrera Sánchez, 2019).

Figura 4

Capacidad antioxidante al final de cada etapa digestiva

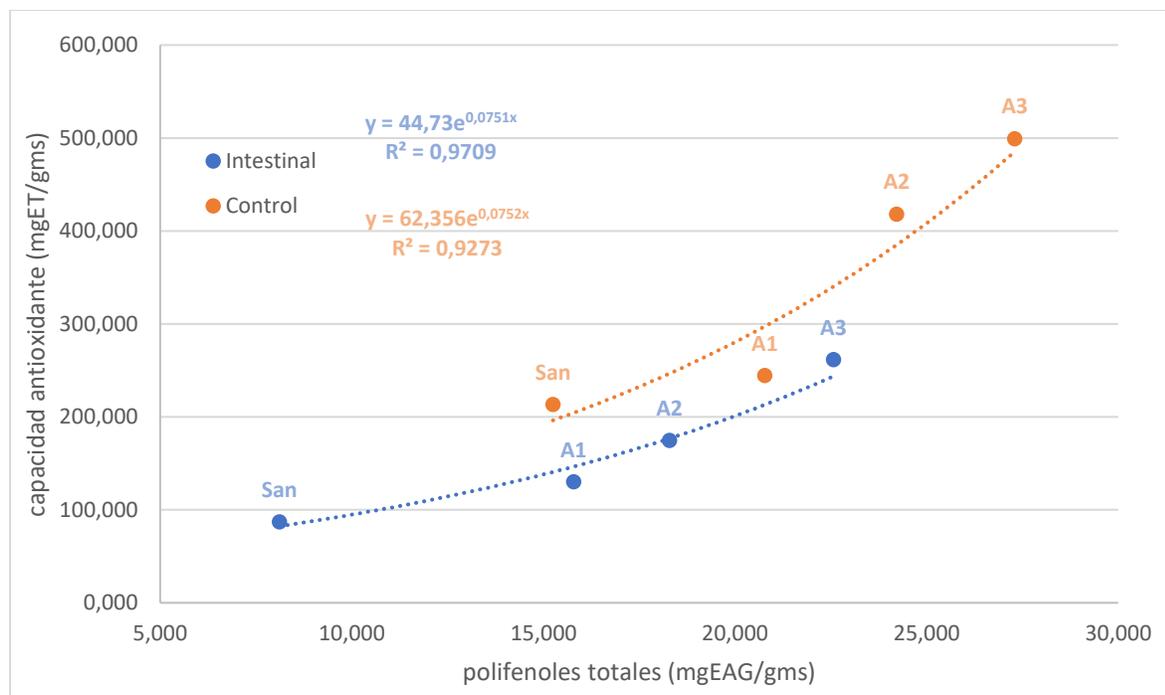


San: chocolate de Santander **Cat:** chocolate de Catatumbo **A1:** Adición 1 **A2:** Adición 2 **A3:** adición 3

En la figura 4 se observa que el uso de extracto liofilizado genera un aumento significativo en capacidad antioxidante de la barra de chocolate antes y durante la digestión gástrica *in vitro* ($p < 0,05$ Apéndice B) obteniendo un valor máximo de $499,3 [mgET/gms]$ para el chocolate antes del proceso digestivo, y un valor de $261,6 [mgET/gms]$ al final de la fase intestinal, obteniendo un incremento de 3 veces la capacidad antioxidante al final de la digestión comparado con el chocolate sin enriquecer.

Figura 5

Capacidad antioxidante vs polifenoles totales



San: chocolate de Santander **Cat:** chocolate de Catatumbo **A1:** Adición 1 **A2:** Adición 2 **A3:** adición 3

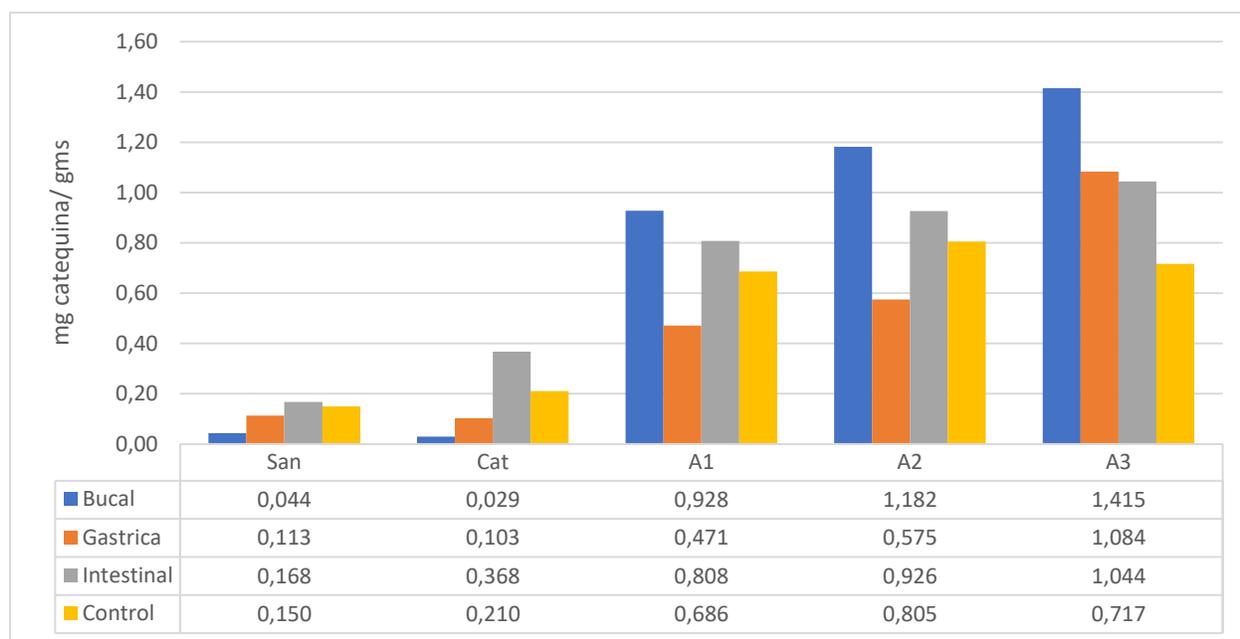
En la figura 5 se aprecia el efecto que tiene el contenido de polifenoles sobre la capacidad antioxidante, tanto para la muestra de control y fase intestinal en el rango evaluado, se observa un comportamiento exponencial que se ajusta mejor que un modelo lineal según el criterio del coeficiente de determinación (R^2). Respecto al cambio de la capacidad antirradicalaria se observa que para la muestra de control se obtuvo aumento del 14%, 95% y 133% y en la fase intestinal del 49%, 100% y 199% para las adiciones 1, 2 y 3 respectivamente, por lo que se puede concluir que pequeños cambios en el contenido fenólico tiene un cambio cuantitativamente significativo en la capacidad antirradicalaria.

5.5. Caracterización de compuestos antioxidantes por el método HPLC

Para los resultados obtenidos por análisis HPLC se analizaron los principales compuestos antioxidantes del cacao, como lo son la catequina (C) y epicatequina (EP).

Figura 6

Catequina en cada etapa digestiva



San: chocolate de Santander **Cat:** chocolate de Catatumbo **A1:** Adición 1 **A2:** Adición 2 **A3:** adición 3

Para la catequina, figura 6, se presenta una variación en la concentración de cada una de las etapas de la digestión *in vitro*, inicialmente se observa que en la fase bucal hay una liberación muy elevada, seguido de una disminución en la fase gástrica, similar a los resultados de polifenoles totales. Para la catequina, figura 6, se presenta variación en la concentración de cada una de las etapas de la digestión *in vitro*, inicialmente se observa que en la fase bucal hay una liberación muy elevada, seguido de una disminución en la fase gástrica, similar a los resultados de polifenoles totales. Por otra parte, en la fase intestinal se observa un incremento de catequina

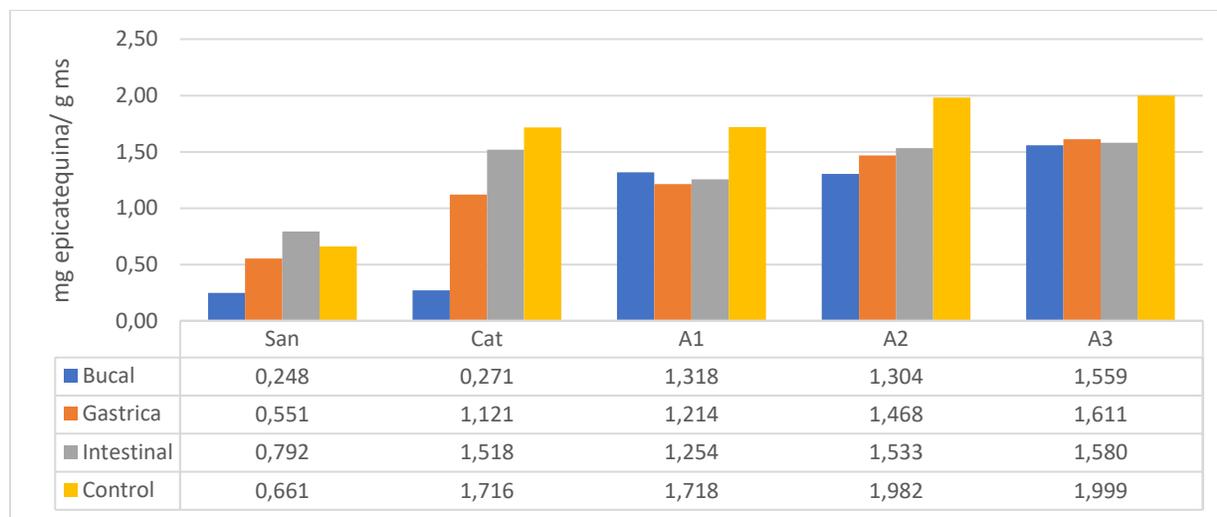
superior al de control por extracción química, esto puede deberse a que los oligómeros (trimeros, tetrámeros y polímeros de mayor peso molecular) sufren ruptura a monómeros y dímeros en el estómago, lo que facilita su absorción intestinal, siendo posiblemente los metabolitos resultantes y/o conjugados de epicatequina, las formas activas (Gutiérrez Maydata, 2002).

Además, los resultados de los chocolates enriquecidos con el extracto presentaron un incremento significativo en la catequina biodisponible al final de la etapa intestinal ($p < 0,05$ Apéndice B), por otra parte, la bioaccesibilidad también presenta un cambio significativo entre las muestras, como se observa en la tabla de ANOVA (Apéndice B).

En las muestras con adición, al final de la digestión se obtienen resultados para A1 de hasta $0,80[mgC/gms]$ lo que representa un incremento de $0,66[mgC/gms]$ (5,71 veces el valor sin adición), mientras que para A3 logra llegar a valores de $1,044mg C/gms$ lo que significa un incremento $0,88[mgC/gms]$ (6,52 veces la cantidad de el chocolate sin adición).

Figura 7

Epicatequina en cada etapa intestinal

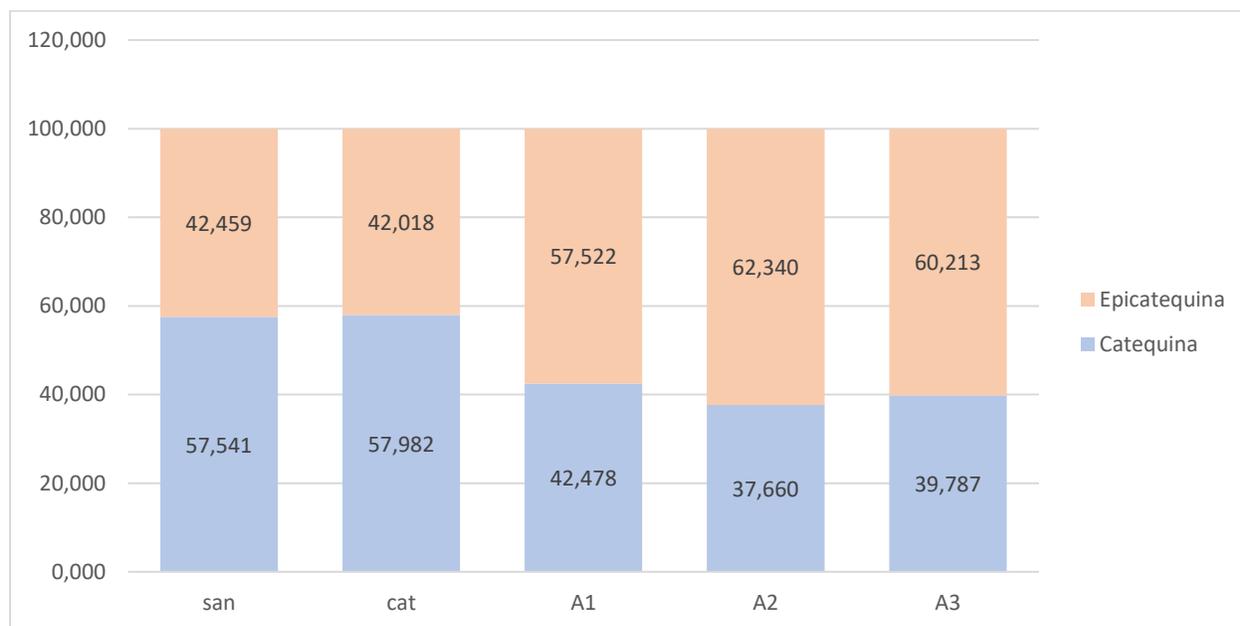


San: chocolate de Santander **Cat:** chocolate de Catatumbo **A1:** Adición 1 **A2:** Adición 2 **A3:** adición 3

Para la epicatequina, figura 7, se presenta un aumento de su concentración en cada una de las etapas de la digestión *in vitro*, donde las adiciones presentan un comportamiento más similar a las muestras sin adición, teniendo un incremento a lo largo de la digestión, además los resultados de los chocolates enriquecidos con el extracto presentaron un incremento significativo en la concentración de epicatequina al final de la etapa intestinal ($p < 0,05$ Apéndice B); pero no se presenta un aumento relevante en la bioaccesibilidad de ésta (Apéndice B). En la muestra A3 se presenta el valor máximo de epicatequina en la fase de control $1,99[mgEP/gms]$, teniendo un incremento de $1,33[mgEP/gms]$ (3 veces más que la muestra sin adición). Por otra parte, al final de la etapa intestinal se obtienen valores de $1,58 mg EP/gms$ teniendo un incremento de $0,79 mg$ epicatequina /gms (2 veces la cantidad de el chocolate sin adición).

Figura 8

Porcentaje de catequina y epicatequina en fase intestinal



San: chocolate de Santander **Cat:** chocolate de Catatumbo **A1:** Adición 1 **A2:** Adición 2 **A3:** adición 3.

En la figura 8 se observa el perfil de distribución porcentual entre los compuestos individuales en la etapa intestinal, en ella se observa que el porcentaje de epicatequina aumenta al realizar las adiciones; Roy (Roy et al., 2010) manifiesta que la epicatequina tiene un efecto muy positivo en la capacidad antirradicalaria, y genera un aumento en los resultados medidos por el método DPPH, lo que podría explicar el incremento exponencial presentado en los resultados de capacidad antirradicalaria obtenidos en este estudio por dicho método.

Por otra parte al analizar específicamente los contenidos de catequina y epicatequina de la fase intestinal, la cual es la más importante para la bioaccesibilidad de los compuestos, se pudo identificar como se presentan un aumento en promedio de 451% para la catequina y un 83,8% para la epicatequina, las cuales son mucho mayores comparados con las muestras sin enriquecimiento; por lo tanto, se infiere que gracias a esto se debe el aumento en la capacidad antirradicalaria, ya

que el método DPPH se ve afectado de manera positiva con el incremento de estos compuestos. Además, también se afecta de manera positiva la bioaccesibilidad ya que los compuestos disponibles en esta etapa son mucho mayores a los presentados en las muestras sin adición, favoreciendo la fracción del compuesto solubilizado durante la digestión gastrointestinal y aumentando la probabilidad de absorción de estos, teniendo así una bioaccesibilidad mucho mayor a la obtenida en el chocolate sin enriquecer.

6. Conclusiones

Las muestras de chocolate de Santander enriquecidas con extracto polifenólico, mostraron un margen de error inferior al 4% en la cuantificación de polifenoles esperados (mediante balance de masa), demostrando que el método usado para el enriquecimiento es eficaz, puesto que las pérdidas de polifenoles en el proceso de adición son muy escasas.

En lo que respecta a la capacidad antioxidante al final de la digestión, en este trabajo se evidenció que existe una relación exponencial entre el contenido de polifenoles y la capacidad antirradicalaria medida por DPPH, obteniendo valores de hasta $261,6[mgET/gms]$ en la fase intestinal (3 veces más que la muestra sin adición); este comportamiento se asocia con el hecho de que en dicha fase hay un incremento substancial de los monómeros más representativos de los extractos polifenólicos del cacao (catequina y epicatequinas), los cuales son reconocidos por su capacidad antioxidante.

De acuerdo con los resultados obtenidos del proceso de digestión *in vitro*, se identificó que un aumento de la concentración de polifenoles conduce a un incremento significativo en los porcentajes de bioaccesibilidad de los mismos al final del proceso de digestión *in vitro*. De acuerdo con esta afirmación se pudo evidenciar que es suficiente realizar una adición de $5,53 mgEAG/gms$ para obtener un porcentaje de bioaccesibilidad del 76% (aumento del 23%).

7. Referencias bibliográficas

- al Bittar, S., Périno-Issartier, S., Dangles, O., & Chemat, F. (2013). An innovative grape juice enriched in polyphenols by microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, *141*(3), 3268–3272. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.134>
- Asenjo, G. A. R. (2016). *Determinación de bioaccesibilidad de polifenoles en murta fresca y jugo de murta (Ugni molinae Turcz)*.
- Balde Balde, I. (2014). *Aplicación de un modelo de digestión" in vitro" para el estudio de estabilidad de compuestos fenólicos de zumo y extracto de granada (Bachelor's thesis)*.
- Barrientos, E. A. P. (2016). *Bioaccesibilidad de Polifenoles, Antocianinas y Capacidad Antioxidante en Murta (Ugni molinae Turcz) Fresca y Liofilizada*.
- Bautista, W. D. (2019). *Plan de negocio para una empresa productora y comercializadora de productos derivados del cacao colombiano*.
- Bergia, M. L., Platinetti, L. A., Porcal Ruiz, M. N., & Sánchez, R. M. (2016). *Galletas a base de harina de trigo enriquecidas con extracto de jengibre rico en polifenoles*.
- Brodkorb, A., Egger, L., Alminger, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, *14*(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Busso Casati, C. I. (2016). *Estabilidad de polifenoles y caracterización físico-química y sensorial en pulpas de frutos rojos en relación a los procesos tecnológicos para la obtención de alimentos e ingredientes alimenticios. Universidad de Buenos Aires*.

- Cantele, C., Rojo-Poveda, O., Bertolino, M., Ghirardello, D., Cardenia, V., Barbosa-Pereira, L., & Zeppa, G. (2020). In Vitro Bioaccessibility and Functional Properties of Phenolic Compounds from Enriched Beverages Based on Cocoa Bean Shell. *Foods*, 9(6), 715. <https://doi.org/10.3390/foods9060715>
- Castaldo, L., Lombardi, S., Gaspari, A., Rubino, M., Izzo, L., Narváez, A., Ritieni, A., & Grosso, M. (2021). In Vitro Bioaccessibility and Antioxidant Activity of Polyphenolic Compounds from Spent Coffee Grounds-Enriched Cookies. *Foods*, 10(8), 1837. <https://doi.org/10.3390/foods10081837>
- Cienfuegos-Jovellanos Fernández, E. (2016). *Estudio del contenido de compuestos bioactivos del cacao y su aplicación en la obtención de un ingrediente rico en (poli) fenoles para el diseño de un chocolate enriquecido.*
- del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Egger, L., Schlegel, P., Baumann, C., Stoffers, H., Guggisberg, D., Brügger, C., Dürr, D., Stoll, P., Vergères, G., & Portmann, R. (2017). Physiological comparability of the harmonized INFOGEST in vitro digestion method to in vivo pig digestion. *Food Research International*, 102, 567–574. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.047>
- Fedecacao. (2022). *La producción cacaotera nacional sigue creciendo: en 2021 logra un nuevo récord histórico.*
- González, R. L. (2016). Digestión de alimentos: Tendencias en los modelos de digestión in vitro. *Revista Doctorado UMH*, 2(2), p5–p6.

- Gutiérrez Maydata, B. A. (2002). Chocolates, polifenoles y protección a la salud. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21.
- Hollman, P. C. H., & Arts, I. C. W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1081–1093.
- Íñiguez, J. C., Avendaño Arrazate, C. H., Campos Rojas, E., López Palestina, C. U., Martínez Bolaños, M., Caballero Pérez, J. F., Báez Alonso, M., & Ariza Flores, R. (2021). Actividad antioxidante en genotipos de *Theobroma* spp. (Malvaceae) en México. *Revista de Biología Tropical*, 69(2). <https://doi.org/10.15517/rbt.v69i2.41626>
- Martini, S., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2018). Bioaccessibility, bioactivity and cell metabolism of dark chocolate phenolic compounds after *in vitro* gastro-intestinal digestion. *Journal of Functional Foods*, 49, 424–436. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.005>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Murillo Mendez, C. J. (2019). *Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal in vitro*.
- Nazario, O., Ordoñez, E., Mandujano, Y., & Arévalo, J. (2018). Polifenoles totales, antocianinas, capacidad antioxidante de granos secos y análisis sensorial del licor de cacao (*Theobroma cacao* L.) criollo y siete clones. *RevIA*, 3(1).
- Olivares, L. D., Cabrera, G. B., & Martínez, M. T. S. (2010). Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia*, 18(50), 10–15.

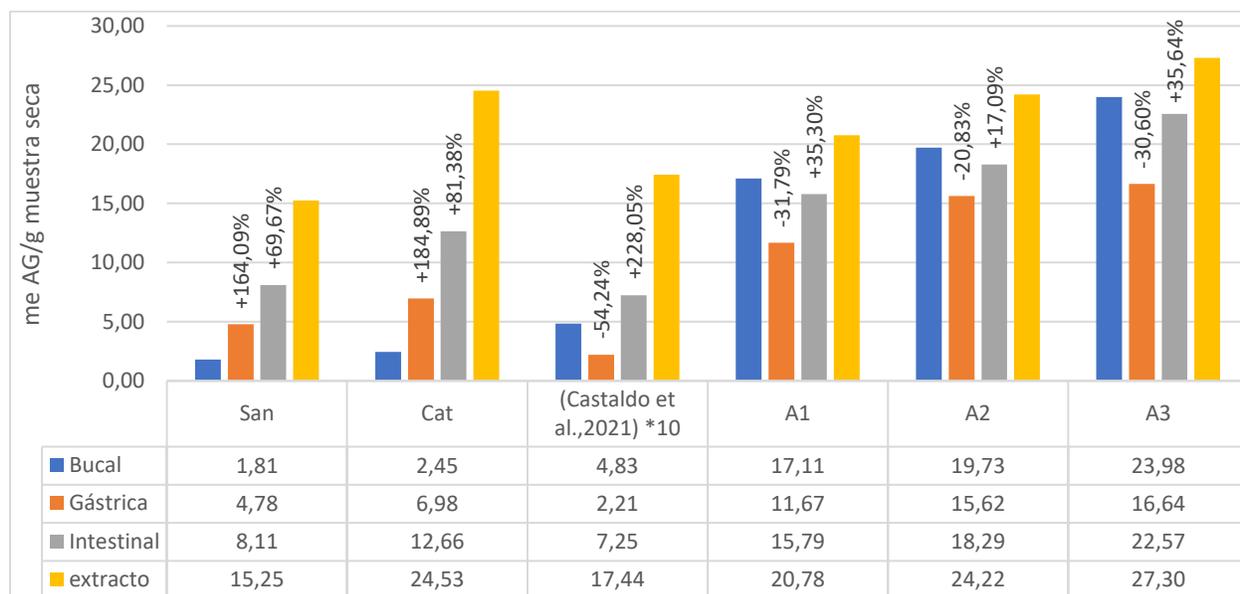
- Pallares Pallares, A., Estupiñán A, M. R., Perea Villamil, J. A., & López Giraldo, L. J. (2017). Impacto de la fermentación y secado sobre el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante del clon de cacao CCN-51. *Revista ION*, 29(2), 7–21. <https://doi.org/10.18273/revion.v29n2-2016001>
- Paredes-López, O., Cervantes-Ceja, M. L., Vigna-Pérez, M., & Hernández-Pérez, T. (2010). Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life—A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(3), 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0177-1>
- Paz-Yépez, C., Peinado, I., Heredia, A., & Andrés, A. (2019). Lipids digestibility and polyphenols release under in vitro digestion of dark, milk and white chocolate. *Journal of Functional Foods*, 52, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.028>
- Perea-Villamil, J. A., Cadena-Cala, T., & Herrera-Ardila, J. (2009). El cacao y sus productos como fuente de antioxidantes: Efecto del procesamiento. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(2), 128–134.
- Perez-Perez, L. M., Leslie García-Borbón, L., González-Vega, R. I., Rodríguez-Figueroa, J. C., Rosas-Burgos, E. C., Huerta-Ocampo, J. Á., Ruiz-Cruz, S., Wong-Corral, F. J., Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E. O., & Del-Toro-Sánchez, C. L. (2018). LIBERACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIGADOS EN EL GARBANZO (*Cicer arietinum* L.) UTILIZANDO MICROBIOTA HUMANA INTESTINAL. *Biotecnia*, 20(3), 146–154. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v20i3.722>
- Pineda-Vadillo, C., Nau, F., Dubiard, C. G., Cheynier, V., Meudec, E., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Tóth, T., Csavajda, É., Hingyi, H., Karakaya, S., Sibakov, J., Capozzi, F., Bordoni, A., & Dupont, D. (2016). In vitro digestion of dairy and egg products enriched with

- grape extracts: Effect of the food matrix on polyphenol bioaccessibility and antioxidant activity. *Food Research International*, 88, 284–292. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.029>
- Quiroga Ruiz, Y., & Herrera Sánchez, D. A. (2019). *Efecto de la adición de polifenoles sobre las características químicas y sensoriales de un chocolate*. Universidad Industrial de Santander.
- Roy, M. K., Koide, M., Rao, T. P., Okubo, T., Ogasawara, Y., & Juneja, L. R. (2010). ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61(2), 109–124. <https://doi.org/10.3109/09637480903292601>
- Sánchez-Valle V, & Méndez-Sánchez N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Med Sur*, 20(3), 161–168.
- Solari-Godiño, A., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., Borderías, A. J., & Moreno, H. M. (2017). Anchovy mince (*Engraulis ringens*) enriched with polyphenol-rich grape pomace dietary fibre: In vitro polyphenols bioaccessibility, antioxidant and physico-chemical properties. *Food Research International*, 102, 639–646. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.044>
- Tenore, G. C., Campiglia, P., Ritieni, A., & Novellino, E. (2013). In vitro bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (*M. pumila* Miller cv Annurca). *Food Chemistry*, 141(4), 3519–3524. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.051>
- Tomás Barberán, F. (2003). *Los polifenoles de los alimentos y la salud*.
- Toro Uribe, S. (2018). *Encapsulation of antioxidants from Theobroma Cacao L. for food applications: in vitro bioaccessibility and kinetic release profile*.

- Torres-Escribano, S., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Calatayud, M., Barrios, L., Vélez, D., Alric, M., & Montoro, R. (2011). Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Science of The Total Environment*, 409(3), 604–611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.021>
- Vázquez Ovando, A., Ovando Medina, I., Adriano Anaya, L., Betancur Ancona, D., & Salvador Figueroa, M. (2016). *Alcaloides y polifenoles del cacao, mecanismos que regulan su biosíntesis y sus implicaciones en el sabor y aroma*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 66(3), 239-254. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222016000300010&lng=es&tlng=es.
- Villamizar-Jaimes, A. R., & López-Giraldo, L. J. (2017). Cáscara de cacao fuente de polifenoles y fibra: simulación de una planta piloto para su extracción. *Respuestas*, 22(1), 75–83. <https://doi.org/10.22463/0122820X.821>
- Zain, M. Z. M., Baba, A. S., & Shori, A. B. (2018). Effect of polyphenols enriched from green coffee bean on antioxidant activity and sensory evaluation of bread. *Journal of King Saud University - Science*, 30(2), 278–282. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.12.003>

Apéndice

Apéndice A: Grafica comparativa de resultados obtenidos con bibliografía (Castaldo et al., 2021)



El porcentaje hace referencia a la magnitud del cambio respecto a la fase anterior, el signo (+) a si hubo aumento y el signo (-) a si hubo disminución

Apéndice B: Tabla de resultados ANOVA

variable de cambio	valor F	valor P
polifenoles bioaccesibles	27,359	0,00015
bioaccesibilidad polifenoles	5,890	0,02010
capacidad antioxidante	19,639	0,00048
catequina bioaccesible	12,596	0,00213
epicatequina bioaccesible	6,844	0,01339
bioaccesibilidad catequina	8,675	0,007
bioaccesibilidad epicatequina	2,795	0,109
disminución de error al aumentar concentración de polifenoles en las adiciones	0.10678	0.9517

Apéndice C: Resultados de bioaccesibilidad en cada etapa de digestión *in vitro*

	Santander	Catatumbo	A1	A2	A3
Bucal	11,869 %	9,988 %	82,339 %	81,462 %	87,839 %
Gástrica	31,344 %	28,455 %	56,160 %	64,492 %	60,952 %
Intestinal	53,180 %	51,610 %	75,987 %	75,516 %	82,674 %