

Evaluación de la bioaccesibilidad *in vitro* de polifenoles de cáscara de cacao encapsulados y formulados en una matriz de chocolate

Jeraldine Pricila Garcés Niño y Karen Fabiana Guerrero González

Trabajo de Grado para optar el título de Ingeniero Químico

Modalidad investigación

Director

Luis Javier López Giraldo

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

Codirector

Astrid Natalia González Morales

Ingeniera Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios por su guía en mi caminar, a todas las personas que me acompañaron, agradezco a cada una de ellas por sus consejos y apoyo durante toda mi formación académica y en especial, durante el desarrollo de esta investigación.

A mi madre Isabel Niño por ser un pilar fundamental en cada paso que he dado, gracias por su esfuerzo, confianza, por su apoyo y ayuda incondicional en cada etapa de mi vida.

A mis hermanos, cuñado y sobrino por su constante apoyo, consejos, alegría y motivación en diferentes momentos.

A mis amigos y compañeros por estar pendientes de cada avance, por su preocupación y apoyo en esta etapa de mi vida.

Gracias a todos por ser parte de este logro.

Jeraldine Garcés

A Dios, por ser mi guía y permitirme culminar esta etapa con satisfacción.

A mis padres, Lucia González e Ivan Guerrero, cuyo apoyo ha sido fundamentales para alcanzar mis metas. Su esfuerzo, dedicación, paciencia y sabios consejos han sido invaluable a lo largo de esta etapa.

A mis profesores, por compartir su conocimiento y por su guía durante mi formación académica.

A mis amigos de la universidad, por su compañía incondicional y apoyo a lo largo de este camino.

Finalmente, dedico este trabajo a todas las personas, que han sido parte de esta etapa, por su apoyo, consejos y buenos deseos han sido esenciales en para mi crecimiento personal y académico.

Karen Guerrero

Agradecimientos

Agradecemos a nuestros directores, el profesor Luis Javier López y la ingeniera Astrid Natalia González, por la oportunidad de trabajar con ellos, el apoyo, confianza y enseñanza recibida en el desarrollo de este proyecto.

Agradecemos al Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA) por permitirnos ser parte de este grupo de investigación, brindarnos su apoyo y su conocimiento.

Agradecemos al profesor Arley Villamizar, Sergio Cáceres, Fabian Castro y a todos los integrantes del grupo por su apoyo y guía en nuestra formación profesional.

Agradecemos a nuestros padres, familiares y amigos por la confianza, la motivación, guía y enseñanza, por ser ejemplo a seguir en nuestras vidas y acompañarnos en todo momento.

Agradecemos a todas las demás personas que se preocuparon y nos motivaron en esta etapa tan importante.

Tabla de Contenido

Introducción	14
1. Objetivos	15
1.1 Objetivo General	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
2. Marco conceptual.....	16
2.1 Generalidades del cacao.....	16
2.2 Polifenoles y sus propiedades	16
2.3 Goma Arábica	17
2.4 Método de Folin-Ciocalteu	17
2.5 Antioxidantes	18
2.6 Generalidades de la encapsulación	19
2.7 Digestión gastrointestinal in vitro.....	19
3. Estado del arte.....	20
4. Metodología	23
4.1 Obtención de los extractos encapsulados y sin encapsular.....	23
4.2 Concentración total y capacidad antioxidante presente en barras de chocolate	23
4.2.1 Formulación de barras de chocolate	23
4.2.2 Extracción de polifenoles en matriz de chocolate.....	24
4.2.3 Cuantificación de chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica	25
4.3 Digestión in vitro	26

4.3.1 Cuantificación polifenoles totales.....	27
4.3.2 Capacidad antioxidante: ORAC.....	28
4.3.4 Determinación de la bioaccesibilidad.....	29
5. Resultados.....	29
5.1 Cuantificación de compuestos polifenólicos.....	29
5.1.1 Contenido total de polifenoles de extractos encapsulados y sin encapsular.....	29
5.1.2 Contenido total de polifenoles en chocolate Boyacá.....	30
5.1.3 Cuantificación de polifenoles totales de chocolates enriquecidos con polifenoles extraídos de la cáscara de cacao.....	31
5.1.4 Cuantificación de polifenoles totales en chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica por coacervación compleja.....	32
5.1.5 Cuantificación de polifenoles totales en chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica obtenidas por secado por aspersión.....	35
5.2 Digestión in vitro.....	39
5.2.1 Muestras sin matriz alimentaria (Blancos).....	39
5.2.2 Diferencias sobre las concentraciones liberadas y porcentajes de bioaccesibilidad de formulaciones de chocolates enriquecidos con extractos encapsulados y sin encapsular.....	43
5.2.2.2 Chocolate enriquecido con cápsulas de goma arábica obtenidas por secado por aspersión y coacervación compleja.....	46
5.3. Evaluación de la capacidad antioxidante.....	50
5.3.1 Variación de la capacidad antioxidante.....	50
5.3.2 Correlación de la capacidad antioxidante.....	54

6. Conclusiones	55
7. Recomendaciones	56
Referencias bibliográficas.....	57
Apéndices.....	70

Lista de tablas

Tabla 1. Composición de soluciones electrolíticas usadas para simular el proceso de digestión in vitro	26
Tabla 2. Contenido total de polifenoles en extractos de polifenoles liofilizados, extractos encapsulados y sin encapsular	29
Tabla 3. Contenido polifenoles totales determinados por método de Folin-Ciocalteu de chocolate Boyacá.....	30
Tabla 4. Cuantificación de polifenoles totales chocolate enriquecido con extractos liofilizados de cáscara de cacao	31
Tabla 5. Cuantificación de polifenoles totales en chocolate enriquecido con cápsulas producidas por coacervación compleja	33
Tabla 6. Cuantificación de chocolate enriquecido con cápsulas mediante secado por aspersión.	36
Tabla 7. Contenido total de polifenoles de cada muestra, sin digestar y digestadas para cada fase	39
Tabla 8. Contenido total de polifenoles en chocolates enriquecidos con extractos liofilizados sin encapsular, en cada una de las fases de la digestión gastrointestinal in vitro.	44
Tabla 9. Contenido total de polifenoles totales de chocolates enriquecidos con cápsulas obtenidas por coacervación compleja y secado por aspersión usando goma arábica como agente encapsulante	46
Tabla 10. Capacidad antioxidante (ORAC) y porcentaje de variación de blancos.....	51

Tabla 11. ORAC capacidad antioxidante y porcentaje de variación de chocolates enriquecidos con extractos sin encapsular de polifenoles a concentraciones de [28, 32 y 36 mgEAG/gmc] 52

Tabla 12. Capacidad antioxidante (ORAC) y porcentaje de variación de chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica por coacervación compleja y secado por aspersión a concentraciones formuladas..... 54

Tabla 13. Coeficientes de correlación Pearson de contenido total de polifenoles y capacidad antioxidante de las muestras no digeridas y las muestras de la fase intestinal 54

Lista de figuras

Figura 1. Formulaciones de chocolate enriquecido con cápsulas de goma arábica por coacervación compleja.....	33
Figura 2. Curva de recuperación de polifenoles de chocolates enriquecidos con cápsulas producidas por coacervación compleja usando goma arábica como material de pared.	34
Figura 3. Formulaciones de chocolate enriquecido con cápsulas de goma arábica obtenidas por secado por aspersión	36
Figura 4. Curva de recuperación de polifenoles de chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica obtenidas por secado por aspersión.....	37
Figura 5. Bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos para cada muestra en cada fase de digestión.....	40
Figura 6. Bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos en chocolate enriquecidos con extractos liofilizado sin encapsular, en cada una de las fases de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	44
Figura 7. Bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos para chocolate enriquecido con cápsulas obtenidas por coacervación compleja y mediante secado por aspersión usando goma arábica como agente encapsulante	47

Lista de apéndices

Apéndice A. Curva de calibración de ácido gálico	70
Apéndice B. Balances de masa para formulaciones de chocolates enriquecidos	70
Apéndice C. Metodologías para cuantificación de chocolate enriquecido con cápsulas.....	72
Apéndice D. Análisis estadísticos	77
Apéndice E. Llenado de microplaca ámbar para análisis ORAC	78

Resumen

Título: Evaluación de la bioaccesibilidad *in vitro* de polifenoles de cáscara de cacao encapsulados y formulados en una matriz de chocolate*

Autor: Jeraldine Pricila Garcés Niño, Karen Fabiana Guerrero González**

Palabras Clave: Bioaccesibilidad, Polifenoles, Antioxidantes, Digestión *in vitro*, Goma arábica.

Descripción:

El cacao es rico en compuestos bioactivos que actúan reduciendo el estrés oxidativo que genera enfermedades neurodegenerativas y cardíacas, entre otras. Los polifenoles extraídos de la mazorca del cacao no solo permiten el aprovechamiento de residuos, sino también la formulación de alimentos nutraceuticos, beneficiosos para la salud. Sin embargo, los polifenoles se degradan o desnaturalizan en el proceso de transformación del cacao y en el tracto digestivo luego de su consumo, limitando su beneficio en el organismo; para protegerlos se ha propuesto su encapsulación usando diferentes técnicas como el secado por aspersión y la coacervación compleja empleando goma arábica como agente de pared que, además, facilita una liberación controlada del compuesto activo en procesos digestivos. De acuerdo con lo anterior, se estudió la bioaccesibilidad y variación de la capacidad antioxidante de chocolate negro formulado con polifenoles encapsulados extraídos de la mazorca del cacao usando como agente de pared la goma arábica mediante dos métodos de encapsulación, secado por aspersión y coacervación compleja. Para este fin se realizó digestión *in vitro* a cada formulación usando el método descrito por Minekus. Para la cuantificación de polifenoles se usó el método de Folin-Ciocalteu y la actividad antioxidante se determinó usando el método de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC). Se observó que la adición de polifenoles encapsulados en la matriz alimentaria permite obtener una bioaccesibilidad de 43,472% y una capacidad antioxidante de 473,451 $\mu\text{molTE/gmc}$ para la concentración de 28 mgEAG/gmc de chocolate enriquecido con encapsulados de secado por aspersión (incremento en la bioaccesibilidad de 100% en comparación al chocolate sin enriquecer). Asimismo, se encontró una correlación directa entre la actividad antioxidante y la cuantificación de polifenoles totales. En conclusión, el enriquecer chocolate con polifenoles encapsulados aumenta su bioaccesibilidad y capacidad antioxidante.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ingenierías fisicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Director: Luis Javier López Giraldo. Ingeniero Químico, PhD. Codirectora: Astrid Natalia González Morales. Ing. Química.

Abstract

Title: Evaluation of the *in vitro* bioaccessibility of encapsulated cocoa husk polyphenols formulated in a chocolate matrix*

Author: Jeraldine Pricila Garcés Niño, Karen Fabiana Guerrero González**

Keywords: Bioaccessibility, Polyphenols, Antioxidants, *in vitro* digestion, Arabic gum.

Description:

Cocoa is rich in bioactive compounds that help reduce oxidative stress, which contributes to neurodegenerative and cardiac diseases, among others. The polyphenols extracted from the cocoa pod not only enable the utilization of waste but also allow the formulation of nutraceutical foods beneficial to health. However, polyphenols degrade or denature during cocoa processing and in the digestive tract after consumption, limiting their benefit in the body. To protect them, encapsulation has been proposed using different techniques such as spray drying and complex coacervation, employing gum arabic as a wall material that also facilitates controlled release of the active compound during digestive processes. In line with this, the bioaccessibility and variation in antioxidant capacity of dark chocolate formulated with encapsulated polyphenols extracted from the cocoa husk were studied, using gum arabic as the wall material through two encapsulation methods: spray drying and complex coacervation. For this purpose, *in vitro* digestion was performed on each formulation using the method described by Minekus. Polyphenol quantification was carried out using the Folin-Ciocalteu method, and antioxidant activity was determined using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method. It was observed that the addition of encapsulated polyphenols to the food matrix resulted in a bioaccessibility of 43.472% and an antioxidant capacity of 473.451 $\mu\text{mol TE/g}$ for a concentration of 28 mg GAE/g of chocolate enriched with spray-dried encapsulates (a 100% increase in bioaccessibility compared to unenriched chocolate). Additionally, a direct correlation was found between antioxidant activity and the quantification of total polyphenols. In conclusion, enriching chocolate with encapsulated polyphenols increases its bioaccessibility and antioxidant capacity.

* Degree thesis

** Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Food Science and Technology Research Group. Director: Luis Javier López Giraldo. PhD Chemical Engineer. Codirectora: Astrid Natalia González Morales. Chemical Engineer.

Introducción

En la fabricación de productos derivados del cacao entre el 70% y 90% de la fruta se desecha como materia residual, incluyendo las cáscaras de la mazorca del cacao, líquidos lixiviados durante la fermentación y las cascarillas de los granos de cacao. El desecho de los residuos sin el tratamiento adecuado puede generar problemas ambientales, sociales y de salud. Algunos autores sugieren la valorización de los subproductos como materias primas potenciales para su uso en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética (Porto de Souza Vandenberghe et al., 2022). Además, se ha reportado la presencia de polifenoles en la cáscara de cacao y sus efectos positivos en la salud (Castillo et al., 2018), entre los que se encuentran la prevención de la oxidación de radicales gracias a su alta capacidad antioxidante, la mejora del flujo sanguíneo y el control de los niveles de azúcar en la sangre debido a la función de la epicatequina (E et al., 2019). Actualmente, existen diferentes técnicas de encapsulación que permiten proteger los compuestos fenólicos ante la degradación, mejorando su estabilidad, bioaccesibilidad y biodisponibilidad. A pesar de las ventajas del encapsulamiento es importante estudiar el efecto de la matriz alimentaria sobre la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos (Grgić et al., 2020). No obstante, existen pocos estudios sobre la adición y liberación de agentes a partir de encapsulados dentro de matrices alimentarias (Eghbal & Choudhary, 2018). Debido a eso, en este trabajo se estudió el impacto de la encapsulación de extractos polifenólicos sobre la bioaccesibilidad y actividad antioxidante de éstos en una matriz de chocolate enriquecida a diferentes concentraciones. Con base en este objetivo de trabajo se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible determinar, mediante un modelo de digestión *in vitro*, si el aumento de la concentración de extractos polifenólicos encapsulados y sin encapsular extraídos de la cáscara de cacao y añadidos a una matriz de chocolate, puede mejorar la bioaccesibilidad y capacidad antioxidante?

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Evaluar la bioaccesibilidad de extractos polifenólicos encapsulados, extraídos de cáscaras de cacao de variedad CCN- 51 y añadidos en formulaciones de chocolate mediante digestión *in vitro*.

1.2 Objetivos Específicos

- Verificar la concentración total y capacidad antioxidante de polifenoles presentes en las formulaciones de las barras de chocolate a diferentes concentraciones formuladas de extractos polifenólicos encapsulados.
- Determinar la bioaccesibilidad de polifenoles presentes en barras de chocolate que evidencien la liberación de compuestos fenólicos mediante digestión *in vitro*.
- Identificar la variación del potencial antioxidante de los extractos polifenólicos posterior a la digestión *in vitro*.

2. Marco conceptual

2.1 Generalidades del cacao

El cacao (*Theobroma cacao* L.) es una semilla grasa, seca y generalmente fermentada del árbol de cacao usada para hacer chocolate, esta especie se desarrolla en climas tropicales húmedos (Origen, expansión y situación actual del cacao, s/f). La industria del cacao genera grandes cantidades de residuos, lo que representa preocupaciones ambientales y riesgos en la salud para los productores de cacao (Díaz Ponce et al., 2023). Aproximadamente el 90% del peso total se desecha como residuo, mientras que solo el 10% se aprovecha para su comercialización y transformación; en lo que respecta a la cáscara de cacao, ésta representa alrededor del 70% al 75% del peso total de los granos del cacao fermentados y secos (Rojo Poveda et al., 2020). La cáscara de cacao está compuesta por carbohidratos, celulosa, proteínas, lípidos y compuestos bioactivos, lo que le confiere un gran un gran potencial para generar productos de valor agregado para diversas industrias (Vásquez et al., 2019).

2.2 Polifenoles y sus propiedades

Los polifenoles son compuestos que contienen uno o más anillos fenólicos en su estructura química y se dividen en varias clases y subclases, como los ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. Estos constituyen el grupo más extenso de sustancias no energéticas en alimentos de origen vegetal, derivados principalmente del metabolismo secundario de las plantas. Los polifenoles tienen una gran capacidad para regular la actividad enzimática e interferir en diversos mecanismos y procesos celulares debido a sus características fisicoquímicas, que les permiten participar en reacciones oxido-reductoras (Quiñones et al., 2012). Los polifenoles tienen una alta capacidad de atrapar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, asociadas al padecimiento de

enfermedades, es decir presentan alta capacidad antioxidante; por esta razón, los polifenoles benefician la salud humana al prevenir enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas. De igual manera, proporcionan protección de rayos UV, y antibióticos (Tomás Barberán, 2003; Valencia-Avilés et al., 2017).

2.3 Goma Arábica

La goma arábica es un polisacárido natural obtenido de árboles de acacia en la región sub-Sahariana del África. Está constituida por una cadena de polisacárido y una pequeña fracción de proteína. Esta goma se usa ampliamente en la industria de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos debido a su baja viscosidad, alta biodegradabilidad y biocompatibilidad; además, no es digestible y actúa como fibra soluble con efecto prebiótico, beneficiando la salud (Andrews, 2012). En la industria alimentaria, se emplea como aditivo multifuncional por sus propiedades emulsionantes, estabilizantes, aglutinantes, formadoras de película y agentes de suspensión (Mendoza Hurtado, 2023).

2.4 Método de Folin-Ciocalteu

El método de Folin-Ciocalteu es un procedimiento de referencia para la cuantificación de polifenoles totales en los alimentos o extractos, para este ensayo una mezcla de ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico se reduce durante el procedimiento para producir un cromóforo azul con una absorbancia a 765 nm, este método se basa en la transferencia de electrones, donde el agente antioxidante actúa como donante de electrones y el reactivo Folin-Ciocalteu como oxidante, causando un cambio de color amarillo a azul, la magnitud del cambio de color es proporcional a la actividad reductora de los polifenoles. La capacidad reductora del antioxidante se mide como equivalentes de ácido gálico (EAG). Los polifenoles reaccionan con el reactivo Folin-Ciocalteu solo en condiciones básicas. La precisión de la prueba está influenciada por

factores como pH, temperatura y duración de la reacción, así como a interferencia en el ensayo relacionados con la matriz del alimento y la capacidad reductora de compuestos no polifenólicos (Pérez et al., 2023) como el ácido ascórbico, el ácido dehidroascórbico (DHA) y azúcares reductores presentes en los extractos de la matriz vegetal (Sánchez Rangel et al., 2013).

2.5 Antioxidantes

Los antioxidantes son sustancias que contrarrestan los efectos de los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno, brindan protección contra el daño causado por el estrés oxidativo y ejercen funciones importantes en la prevención de enfermedades crónicas (Zehiroglu & Ozturk Sarikaya, 2019). Según su origen, los antioxidantes se pueden clasificar como endógenos y exógenos. Los antioxidantes endógenos son sintetizados por el cuerpo humano y pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Por otro lado, los antioxidantes exógenos deben suministrarse a través de la dieta alimentaria, estos incluyen la vitamina E, la vitamina C, oligoelementos (Se, Cu, Zn, Mn) y fotoquímicos como isoflavonas, polifenoles y flavonoides (Martemucci et al., 2022).

Los polifenoles abarcan un grupo importante de fitoquímicos naturales y se encuentran en frutas, verduras, cereales, vino tinto, té, café y cacao, entre otros (Scalbert et al., 2005). Los compuestos polifenólicos presentes en el cacao y sus derivados son las catequinas o flavan-3-oles (37%), antocianinas (4%) y proantocianidinas (4%); desempeñan un papel importante en la actividad protectora, especialmente se destacan las catequinas por su potencial antioxidante. La cáscara de cacao también dispone de propiedades antioxidantes, debido a las procianidinas (Felice et al., 2020). La actividad antioxidante existe diferentes métodos que se dividen en tres categorías: espectrometría, ensayos electroquímicos y cromatografía (Munteanu & Apetrei, 2021).

2.6 Generalidades de la encapsulación

La encapsulación consiste en recubrir un material central (sólido, líquido o gaseoso) con micro y/o nanoestructuras con materiales de pared, este procedimiento permite aumentar la estabilidad física o química de compuestos bioactivos (Zabot et al., 2022). Actualmente, los métodos de encapsulación que existen para el procesamiento de compuestos bioactivos son el secado por aspersión, liofilización, coacervación compleja, recubrimiento en lecho fluidizado y extrusión, entre otros. El secado por aspersión es la técnica más ampliamente usada en la industria alimentaria debido a su bajo costo, operación continua, alto índice de producción y alta eficiencia (Huang et al., 2023). El mecanismo de secado por aspersión se compone de tres etapas principales (atomización, conversión de gota a partícula y recolección de partículas), en el proceso de secado por aspersión se transforma un fluido en partículas secas al rociar un alimento homogéneo (compuesta por materiales de núcleo y pared) en un medio de secado caliente al volatilizar el contenido de agua presente en las gotas del líquido (Mounika et al., 2021). Por su lado, la coacervación compleja es usada mayormente para encapsular materiales hidrófobos y susceptibles al calor, es conocida por su bajo costo, reproducibilidad, simplicidad, alta eficiencia de encapsulación y la óptima estabilidad en condiciones de almacenamiento, y se basa en la interacción electrostática de polímeros con cargas opuestas en soluciones acuosas, mientras que, en la fase concentrada ocurre un equilibrio electrostático (Eghbal & Choudhary, 2018).

2.7 Digestión gastrointestinal *in vitro*

La digestión gastrointestinal *in vitro* ampliamente utilizado para estudiar la digestibilidad y la liberación de componentes alimentarios en condiciones gastrointestinales simuladas. Este método replica las condiciones del tracto gastrointestinal, incluyendo la presencia de compuestos y enzimas digestivas ajustadas a las condiciones de una digestión *in vivo*. De igual manera, se

controlan las condiciones de pH, temperatura, y otros factores (Hur et al., 2011). Dentro de la red COST Infogest se propuso un estandarizado para la digestión gastrointestinal *in vitro* llamado “*A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus*”, con el objetivo de obtener resultados congruentes en los diferentes estudios que se realicen siguiendo este modelo de digestión (Minekus et al., 2014).

Es importante destacar que los resultados de los modelos de digestión *in vitro* pueden proporcionar información valiosa, difiriendo de los obtenidos en modelos *in vivo*, esto debido a las limitaciones para simular con precisión los complejos procesos fisicoquímicos y fisiológicos que ocurren en el tracto digestivo real. Sin embargo, los modelos de digestión *in vitro* presentan ventajas como ofrecer resultados con menor costo, no requieren el uso de organismos o seres vivos, y la capacidad de ser reproducibles en grandes cantidades (Minekus et al., 2014)

3. Estado del arte

La digestión humana es un tema complejo que se ha estudiado por muchos años, en el cual se busca obtener información versátil sobre los efectos adversos o favorables en la salud como resultado de la absorción de nutrientes presentes de forma natural o adicionada en los alimentos (Andrés & Alicia, 2019). La digestión humana se puede estudiar mediante la aplicación de dos modelos: la digestión *in vitro* y la digestión *in vivo*. Al respecto, se han realizado diferentes investigaciones para evaluar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos como extractos polifenólicos sin encapsular y encapsulados.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos por diferentes autores como Feng *et al.* (Feng et al., 2020), Cardoso de Souza *et al.* (Cardoso de Souza et al., 2022), Ferreira Santos *et al.* (Ferreira Santos et al., 2021) y Martínez Cifuentes (Martínez Cifuentes, 2017), acerca de la

bioaccesibilidad de extractos polifenólicos encapsulados y sin encapsular. Así mismo, se analizará el efecto de las condiciones gástricas e intestinales en la liberación y degradación de compuestos polifenólicos. Además, se resalta la importancia de encapsular compuestos bioactivos para aumentar su estabilidad ante las condiciones del modelo de digestión simulado.

En el estudio realizado por Feng et al. (Feng et al., 2020), se evidenció que la cinética de liberación de los extractos polifenólicos encapsulados de *Juglans regia L.* en soluciones de alginato de sodio cambió con el perfil de pH. Se observó una cinética de liberación sostenida para pH 3.0; mientras que a pH 1.0 la cinética de liberación fue acelerada. Los autores explican que este comportamiento podría deberse a que el pH del jugo gástrico estaba cerca a la acidez pKa del alginato de sodio. En la digestión intestinal, la liberación de los compuestos polifenólicos del microgel se presentó debido a que el pH de la mezcla digestiva era neutro y similar al pH del alginato de sodio. Finalmente, la variación de la composición polifenólica de los extractos sin encapsular y encapsulados cambió significativamente en el intestino delgado. La encapsulación de los extractos previene la degradación de los compuestos polifenólicos durante la digestión gastrointestinal, facilitando su liberación y absorción en el intestino delgado. Por su parte, Cardoso de Sousa *et al.* (Cardoso de Souza et al., 2022), presenta los siguientes resultados; los polifenoles extraídos de las hojas de *Bauhinia forticata* obtenidos por infusión y decocción encapsulados en maltodextrina y dióxido de silicio coloidal mediante secado por aspersión, presentaron un índice de bioaccesibilidad de acción antioxidante en la fase intestinal de 25 % y 7,99%, respectivamente, por el método de ORAC. Para los extractos acuosos obtenidos por infusión encapsulados se evidenció que el 52,68 % de los polifenoles fueron bioaccesibles, los autores exponen que los polifenoles encapsulados en maltodextrina y dióxido de silicio coloidal son liberados en la digestión gastrointestinal debido a la acción de la hidrólisis ácida y la pepsina (en el estómago

simulado) y al cambio de pH en el intestino delgado, debido a que el cambio de pH favorece la formación de nuevos metabolitos.

Así mismo, Ferreira *et al.* (Ferreira Santos et al., 2021), en su investigación con extractos polifenólicos de la corteza de pino sin encapsular y encapsulados en maltodextrina evidenciaron que, durante la fase oral el contenido de polifenoles de los extractos sin encapsular, presentaron una reducción significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con los extractos de polifenoles encapsulados. Este comportamiento se mantuvo para las fases gástricas e intestinal en donde el contenido de polifenoles se redujo en un 20% más para los extractos sin encapsular que para los encapsulados. Los autores explican que la reducción más marcada en los extractos sin encapsular se debe a la inestabilidad que presentan los polifenoles presentes en los extractos ante variaciones de pH y a la presencia de enzimas como la pepsina en la fase gástrica. Además, los autores evidenciaron que el contenido de los polifenoles de los extractos encapsulados, comparado con los extractos sin encapsular aumentó para la fase oral en 11%, para la fase gástrica en 15% y para la fase intestinal en un 14% durante las condiciones de digestión. Los resultados obtenidos por Martínez Cifuentes (Martínez Cifuentes, 2017), mostraron que se presenta una mayor bioaccesibilidad para los microencapsulados de *Passiflora Mollissima*, debido a que la encapsulación permite obtener una mayor cantidad de polifenoles en la fase intestinal, para los liofilizados no encapsulados se evidenció una pérdida del 43% de polifenoles, debido a los cambios de pH o medios alcalinos en la fase gástrica e intestinal durante la digestión *in vitro*.

Por otro lado, en un estudio realizados por Poliński *et al.*, (Poliński et al., 2021), se evidenció que la adición del 5% de compuestos fenólicos extraídos de bayas de saúco, flores de saúco y aronias a una matriz de chocolate aumento la bioaccesibilidad intestinal en 6,327%, 15,389% y 13,83%, respectivamente; comparado con el chocolate sin enriquecer. Sin embargo,

Martini et al., (Martini et al., 2018b) en su estudio observó una menor bioaccesibilidad intestinal de compuestos polifenólicos para chocolates negros enriquecidos con extractos de té de Sakura (68,2%) y polvo de cúrcuma (40,1%) en comparación con chocolate negro sin enriquecer (68,7%), esto puede estar relacionado con la estabilidad de los compuestos ante las condiciones gastrointestinales. No obstante, no se encontraron estudios que evaluaran el efecto de diferentes concentraciones en matrices alimentarias grasas.

En conclusión, los autores exponen que la mayor bioaccesibilidad se presenta para los extractos encapsulados, debido a que, la encapsulación ofrece una mayor protección de los polifenoles ante las condiciones gástricas y los cambios de pH durante el proceso gastrointestinal simulado, lo que finalmente reduce la cantidad de polifenoles en la fase intestinal.

4. Metodología

4.1 Obtención de los extractos encapsulados y sin encapsular

Los extractos liofilizados de polifenoles extraídos de cáscaras de cacao encapsulados y no encapsulados en goma arábica por coacervación compleja y secado por aspersion fueron suministrados por el grupo de investigación CICTA.

4.2 Concentración total y capacidad antioxidante presente en barras de chocolate

4.2.1 Formulación de barras de chocolate

Para la elaboración de las formulaciones de chocolate enriquecido, se empleó la metodología descrita por Belščak-Cvitanović *et al.*, (Belščak-Cvitanović et al., 2012) con algunas modificaciones. El chocolate Boyacá fue suministrado por el grupo de investigación CICTA para el desarrollo del proyecto. Primero, se derritieron 100 g de chocolate proveniente del departamento de Boyacá al 100% de cacao a baño maría hasta alcanzar una textura líquida. Luego, en un

refinador de dos rodillos de piedra (ECGC12SLTA - CocoaTown) se añadió el chocolate y los extractos polifenólicos, una vez se determinó el contenido total de polifenoles en el chocolate, se establecieron tres concentraciones equidistantes, con un aumento máximo de polifenoles de 10 mgEAG/gmc (gramos de muestra de chocolate) con relación a la concentración del chocolate sin enriquecer, teniendo en cuenta los balances de materia (véase Apéndice B). Se limitó el aumento de polifenoles a esta concentración, debido a que incrementos superiores podrían ocasionar alteraciones significativas en su textura y sabor (Delfanian & Sahari, 2020). Para determinar la finalización de la etapa de refinado, se tomaron lecturas del tamaño de partícula de las muestras de chocolate enriquecido usando un micrómetro digital (Mitutoyo) hasta obtener un tamaño de partícula en el rango de 0,017-0,030mm.

A continuación, el atemperado del chocolate se llevó a cabo en una atemperadora de chocolate (Minitemper Pavoni). Se seleccionaron las siguientes condiciones: el ciclo de fusión se realizó durante 3 min a 48°C, el enfriamiento a 29,5 °C durante 3 min y el calentamiento final se llevó a cabo durante 10 min a 34° C (Minitemper, s/f). Posteriormente, el moldeado se realizó en moldes de silicona. Finalmente, los chocolates moldeados se refrigeraron.

El procedimiento anteriormente descrito se realizó para obtener barras de chocolate enriquecido a tres concentraciones de 28, 32 y 36 expresadas en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra de chocolate (mgEAG/gmc) con extractos polifenólicos de cáscara de cacao, microcápsulas de polifenoles con goma arábiga por coacervación compleja y secado por aspersión

4.2.2 Extracción de polifenoles en matriz de chocolate

Para extraer los polifenoles presentes en el chocolate previamente enriquecido se usó la metodología propuesta por Toro (2018). Para lo cual se tomó 1 g de cada muestra de chocolate

enriquecido con polifenoles y 20 ml etanol/agua (80% v/v); la extracción se inició cuando la solución etanol/agua alcanzó la temperatura de 60 °C y se agregó la muestra de chocolate en agitación constante, manteniendo la temperatura (60 °C) por 15 min. Luego el medio de extracción se centrifugó por 15 min a condiciones de 4000 rpm y 4 °C con el objetivo de precipitar insolubles. Se procedió a retirar el sobrenadante y almacenarlo a -20 °C para posteriores análisis. (Toro-Uribe, 2018). El contenido total de polifenoles en el sobrenadante se cuantificó utilizando el método de Folin Ciocalteu descrito en el inciso 4.3.1.

4.2.3 Cuantificación de chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábiga

Para la cuantificación de polifenoles totales de formulaciones de chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábiga se siguió el procedimiento descrito por Hernández Pérez (Hernández Pérez, 2020) con algunas modificaciones. Se tomaron 0,3 g de sólidos de chocolate y se añadieron 5 ml de hexano (GA 98% de pureza) llevando a cabo un proceso de extracción de la materia grasa durante tres ciclos combinados de agitación durante 5 minutos, inmersión en baño ultrasónico por 5 minutos y centrifugación (2 minutos, 5000 rpm y 4°C). Al finalizar el tercer ciclo de centrifugación se eliminó el disolvente orgánico residual (hexano) y se procedió a realizar la extracción de los compuestos polifenólicos empleando una solución de agua/etanol al 80%. Posteriormente, el pH de la solución se aumentó a 12 con el objetivo de extraer los compuestos polifenólicos de las cápsulas y finalmente se redujo a pH 7 para evitar interferencia en la posterior cuantificación de polifenoles totales. Por último, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes recolectados se filtraron. La cuantificación de compuestos polifenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu descrito en el inciso 4.3.1.

4.3 Digestión *in vitro*

Para establecer la bioaccesibilidad y concentración de polifenoles totales de los extractos sin encapsular y encapsulados en goma arábica, se realizaron tres fases las cuales consisten en representar el proceso digestivo, para ello se usó la metodología descrita por Minekus et al., (Minekus et al., 2014) y modificada por (Murillo-Méndez et al., 2021)

Tabla 1

*Composición de soluciones electrolíticas usadas para simular el proceso de digestión *in vitro**

Compuesto	Simulación de Solución Bucal (SSF) [mM]	Simulación de jugos gástricos (SFG) [mM]	Simulación de Jugo Intestinal (SIF) [mM]
KCl	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	13,6	25	85
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0,15	0,1	0,33
(NH ₄)Cl	0,06	0,5	-
NaCl	-	47,2	38,4

Nota. Adaptado de Suárez Díaz & Mejía Alquichire (Suárez Diaz & Mejía Alquichire, 2022).

Las enzimas α -amilasa, pepsina y pancreatina se prepararon el mismo día que se realizó la digestión para asegurar su actividad enzimática, así como su calidad y estabilidad.

Primero, se realizó la etapa de digestión bucal, preparando la solución electrolítica que simula los contenidos bucales (SSF) (Tabla 1). Luego se mezclaron 1,75 mL de la solución electrolítica con 2,5 g de muestra y se añadieron 0,25 mL de solución enzimática de α -amilasa a 1500 U/mL (diluida en SSF), de igual manera se agregó 12,5 μ L de CaCl₂ y 0,4875 mL de agua. Esta mezcla se mantuvo a una temperatura de 37 °C y agitación constante de 200 rpm por un tiempo establecido de 2 minutos, manteniendo un pH neutro (pH: 7).

Segundo, se preparó la solución gástrica (SFG) según como aparece en la Tabla 1. Después se mezclaron 3,75 mL de la solución SFG con el resultante de la fase bucal; además, se agregaron 0,8 mL de pepsina porcina a 25000 U/mL (diluida en SFG); 2,5 μ L de CaCl_2 a 0,3 M, 0,1 mL HCl a 1 M y 0,3475 mL de agua, esta fase se mantuvo a temperatura de 37°C durante 2 horas con agitación constante (200 rpm), controlando que el pH se mantenga entre (2,9-3,1).

Terminada la fase gástrica se añadieron 5,5 mL de solución electrolítica que simula el jugo intestinal (SIF) en la solución de la etapa anterior; luego se agregaron 2,5 mL de pancreatina disuelta en solución SIF (1,25 mL de bilis al 0,5%, 20 μ L de CaCl_2 a 0,3 M, 0,4 mL NaOH a 1 M y 0,3 mL de agua). La mezcla se agitó constantemente (200 rpm) durante 2 horas controlando un pH entre (6,9-7,1) y una temperatura entre 36 y 37 °C.

Luego de cada etapa se tomó una muestra de 1 mL de cada sustancia, se enfrió inmediatamente y se centrifugó a 10000 rpm por 20 minutos a fin de precipitar las sustancias insolubles, se tomó el sobrenadante se filtró y se almacenó a -20 °C para luego ser usado en los siguientes análisis: cuantificación de polifenoles totales y capacidad antioxidante ORAC.

4.3.1 Cuantificación polifenoles totales

La determinación de la cantidad de polifenoles totales se realizó por el método de Folin-Ciocalteu. Este procedimiento se realizó a las muestras recolectadas después de su extracción desde las barras de chocolate sin enriquecer y enriquecidas; así como de las muestras antes y después de la digestión *in vitro*. A continuación se describe un ensayo típico: se tomaron 50 μ L de la muestra con 1,5 mL de solución compuesta por el reactivo Folin-Ciocalteu y agua destilada en una proporción (10% v/v), después la mezcla se agitó en un vortex a 1500 rpm durante 15 segundos, esta se dejó en reposo y oscuridad por 5 min, posteriormente se agregaron 1,5 mL de carbonato de sodio (7,5% p/v); esta mezcla se agitó en un vortex durante 15 segundos y las

muestras se dejaron en oscuridad por 1 hora, por último, se midió la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan) se calculó la concentración a partir de la curva de calibración del ácido gálico adjunto en el Apéndice A (Suárez Diaz & Mejía Alquichire, 2022).

4.3.2 Capacidad antioxidante: ORAC

La capacidad antioxidante del extracto de polifenoles después de la digestión *in vitro* se determinó mediante el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), siguiendo la metodología propuesta por Huang et al. En resumen, se llenaron microplacas de noventa y seis pozos con 150 µL de la solución de fluoresceína de trabajo diario ($8,16 \times 10^{-5}$ M en tampón fosfato 75 mM, pH 7,4) y 25 µL de la muestra recuperada en cada una de las etapas de digestión simulada. Luego, se incubaron a 37 °C durante 10 min en un lector de microplacas (Synergy HT MultiDetection, Biotek Instruments, Inc. Winooski, VT, EE. UU.) (Ver Apéndice E). La reacción se inició con la adición de 25 µL de solución de AAPH (153 mM en tampón fosfato 75 mM, pH 7,4). Luego se monitoreó, cada minuto durante una hora, el decaimiento de la señal de la fluorescencia utilizando longitudes de onda de emisión y excitación de 485 y 528 nm, respectivamente. Paralelamente se preparó una curva de calibración con concentraciones de Trolox que variaron entre 3 y 25 µmol/mL como lo indica la siguiente ecuación:

$$ORAC = \frac{ABC_{muestra} - ABC_{blanco}}{ABC_{Trolox} - ABC_{blanco}} \times k \times \frac{Molaridad\ del\ Trolox}{Peso\ de\ la\ muestra} \quad (Ec. 1)$$

Donde k es el factor de dilución de la muestra y ABC es el área debajo de la curva de disminución de la fluorescencia de la muestra, el blanco y Trolox, respectivamente. (Pico-Hernández et al., 2020)

4.3.4 Determinación de la bioaccesibilidad

Para determinar la bioaccesibilidad de los polifenoles se usó la siguiente expresión, donde se relacionan los contenidos de polifenoles en fase orgánica y los presentes en las muestras iniciales (Delfanian & Sahari, 2020a).

$$\% \text{Bioaccesibilidad} = \left(\frac{CP_{DD}}{CP_{AD}} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde CP_{DD} es el contenido total de polifenoles después de la digestión, presentes en las muestras analizadas al final de cada fase de digestión intestinal y CP_{AD} es el contenido de polifenoles totales de la muestra inicial antes de la digestión *in vitro*.

5. Resultados

5.1 Cuantificación de compuestos polifenólicos

5.1.1 Contenido total de polifenoles de extractos encapsulados y sin encapsular

En la Tabla 2 se observan la concentración de polifenoles totales de los extractos de cáscara de cacao sin encapsular (liofilizados) y encapsulados por coacervación compleja y secado por aspersión en goma arábica. La cuantificación del contenido total polifenoles de cada muestra fue determinada usando el método de Folin Ciocalteu.

Tabla 2

Contenido total de polifenoles en extractos de polifenoles liofilizados, extractos encapsulados y sin encapsular

Muestra	Contenido de polifenoles totales [mgEAG/gE*]
Extractos polifenólicos liofilizados obtenidos de cáscara de cacao	90,479
Cápsulas de goma arábica por coacervación compleja	13,195
Cápsulas de goma arábica mediante secado por aspersión	12,645

Nota. Datos aportados por el grupo de investigación CICTA. *gE :gramo de extracto

5.1.2 Contenido total de polifenoles en chocolate Boyacá

Para establecer las concentraciones finales del contenido total de polifenoles a las cuales se formularon los chocolates enriquecidos, inicialmente se realizó un análisis del contenido de polifenoles presente en el chocolate Boyacá; en la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación por el método de Folin-Ciocalteu.

Tabla 3

Contenido polifenoles totales determinados por método de Folin-Ciocalteu de chocolate Boyacá

Peso muestra [g]	Volumen total medio extracción [ml]	DO1	DO2	Dprom	Concentración PT [mgEAG/gmc]
1,000	20	1,197	1,122	1,119	27,030
1,000	20	1,102	1,234	1,072	25,906
1,075	20	1,507	1,262	1,289	28,966
1,075	20	1,024	1,393	1,113	25,009
Concentración promedio					26,728±1,706

Se observa que la concentración promedio de polifenoles presentes en chocolate negro proveniente del departamento de Boyacá al 100% cacao es de 26,728 mgEAG/gmc; este valor es superior al resultado obtenido por Poliński et al., (Poliński et al., 2021) quienes reportaron una concentración de polifenoles de 11,7 mgEAG/gms para chocolate negro con un 45% de sólidos de cacao. Igualmente, el contenido de polifenoles reportado en este trabajo también fue mayor que el determinado por Martini et al., (Martini et al., 2018b), los cuales reportaron una concentración de polifenoles totales de 7,876 mgEAG/gmc para chocolate negro al 70% cacao. Estas diferencias pueden deberse a que, a mayor contenido de sólidos de cacao, mayor será el contenido de polifenoles presentes en los chocolates (Urbańska & Kowalska, 2019); además, varía según la

variedad de cacao, condiciones ambientales del cultivo y el método de extracción empleado (Pico Hernández et al., 2019).

Conociendo el contenido total de polifenoles presentes en el chocolate Boyacá, se añadieron los extractos de acuerdo con los balances de masa descritos en el Apéndice B, con el fin de obtener barras de chocolate a concentraciones de 28, 32 y 36 mgEAG/gmc, como se menciona en el inciso 4.2.1.

5.1.3 Cuantificación de polifenoles totales de chocolates enriquecidos con polifenoles extraídos de la cáscara de cacao

Se formularon chocolates con la adición de polifenoles liofilizados obtenidos de la vaina de cacao siguiendo la metodología descrita previamente y considerando las concentraciones específicas de cada uno, así como los balances anteriormente descritos. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu para chocolates enriquecidos con extractos de polifenoles de cáscaras de cacao liofilizados.

Tabla 4

Cuantificación de polifenoles totales chocolate enriquecido con extractos liofilizados de cáscara de cacao

Abreviaturas	Concentración Teórica [mgEAG/gmc]	Conc. Exp. PT [mgEAG/gmc]	Prom. Concentración Exp. promedio [mgEAG/gmc]	Error*
C1	28	28,959 28,959	28,959±0,000	3,312%
C2	32	34,228 32,601	33,414± 1,150	4,233%
C3	36	37,817 37,029	37,423± 0,557	3,803%

*Discrepancia entre el valor teórico y experimental de las concentraciones

La discrepancia entre los datos teóricos y los obtenidos experimentalmente después del enriquecimiento son comparables a los reportados obtenidos por Suárez Díaz & Mejía Alquiriche (Suárez Díaz & Mejía Alquichire, 2022) quienes observaron diferencias del 2,1% al 6,6% al añadir polifenoles extraídos del grano de cacao en chocolate Santander.

5.1.4 Cuantificación de polifenoles totales en chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica por coacervación compleja

La metodología seleccionada para determinar el contenido total de polifenoles presente en las formulaciones (Apéndice C) reportó concentraciones de polifenoles más bajas de las esperadas y considerando que, no hay pérdidas significativas de cápsulas en el proceso de formulación de las barras de chocolate como se observa en la Tabla 5, se determinó que el método utilizado para realizar la extracción de los polifenoles desde las cápsulas no logró cuantificar en su totalidad los compuestos presentes en la matriz alimentaria a las concentraciones de 28, 32 y 36 mgEAG/gmc; por lo tanto, se procedió a determinar el porcentaje de recuperación de polifenoles al aplicar la metodología previamente mencionada con el objetivo de obtener una correlación en los datos. El bajo porcentaje de extracción obtenido por la metodología previamente mencionada en la cuantificación de los polifenoles puede estar relacionada con el tipo de solvente usado para la extracción de polifenoles en chocolate (Komes et al., 2013).

Tabla 5

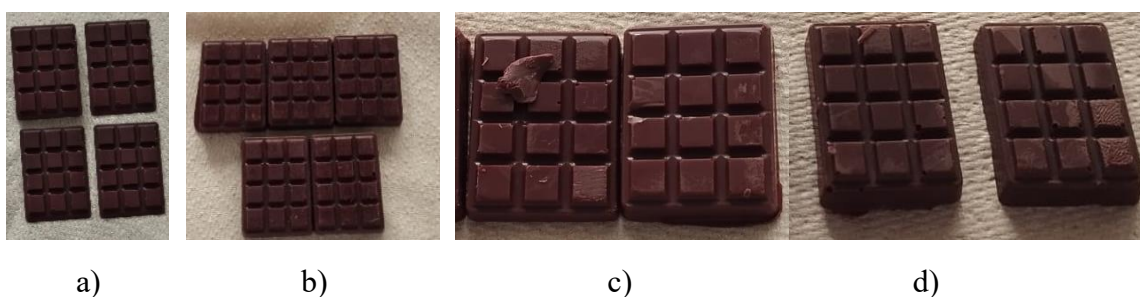
Cuantificación de polifenoles totales en chocolate enriquecido con cápsulas producidas por coacervación compleja

Abreviaturas	Concentración esperada [mgEAG/gmc]	Conc. PT [mgEAG/gmc]	Prom. Concentración PT Experimental [mgEAG/gmc]	Recuperación Polifenoles*
C1	28	16,334 15,904	16,119±0,304	57,566%
C2	32	12,740 12,349	12,544±0,276	39,201%
C3	36	7,704 9,950	8,827±1,588	24,19%

*El porcentaje de recuperación de polifenoles totales hace referencia a la cantidad de polifenoles que se lograron extraer respecto a la concentración establecida para cada chocolate

Figura 1

Formulaciones de chocolate enriquecido con cápsulas de goma arábica por coacervación compleja



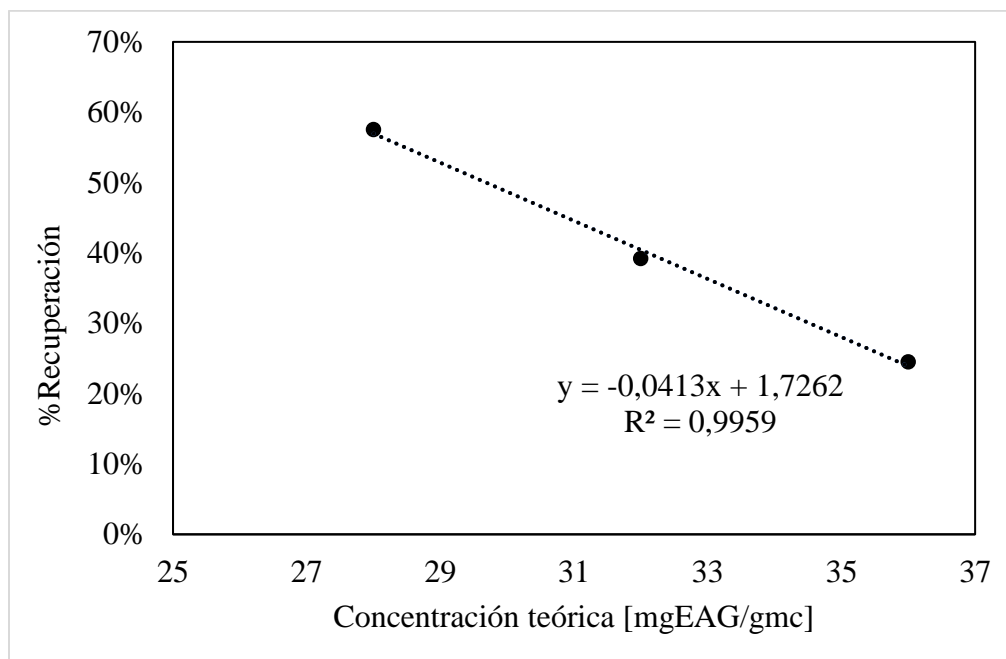
Nota. Concentraciones de las formulaciones a) chocolate sin adición. b) 28 mgEAG/gmc. c) 32 mgEAG/gmc. d) 36 mgEAG/gmc

En la Figura 1, se ilustran las barras de chocolate obtenidas tras la incorporación de cápsulas de polifenoles producidas por coacervación compleja usando goma arábica como material de pared, se observa como los chocolates enriquecidos presentaron cambios en sus propiedades

físicas, como un cambio en el color hacia un tono mate en la superficie de la barra. Además, a medida que aumentaba la concentración de cápsulas añadidas en las formulaciones, se observó un incremento en la viscosidad de las mismas. Esto se atribuye a una disminución en la concentración de la fase grasa libre del chocolate (Lončarević et al., 2018).

Figura 2

Curva de recuperación de polifenoles de chocolates enriquecidos con cápsulas producidas por coacervación compleja usando goma arábica como material de pared



En la anterior figura se observa que, la concentración y los porcentajes de recuperación de polifenoles totales disminuyen a medida que aumenta la concentración de las formulaciones enriquecidas ajustándose a un modelo lineal (Figura 2). Además, se observa que la recuperación de los polifenoles no es completa, dando un valor de contenido polifenólico menor al de chocolate sin enriquecer. Este comportamiento, también fue observado por autores como Chen *et al.*, (Chen et al., 2021), quienes reportaron una liberación menor al 36% siguiendo un modelo de primer orden

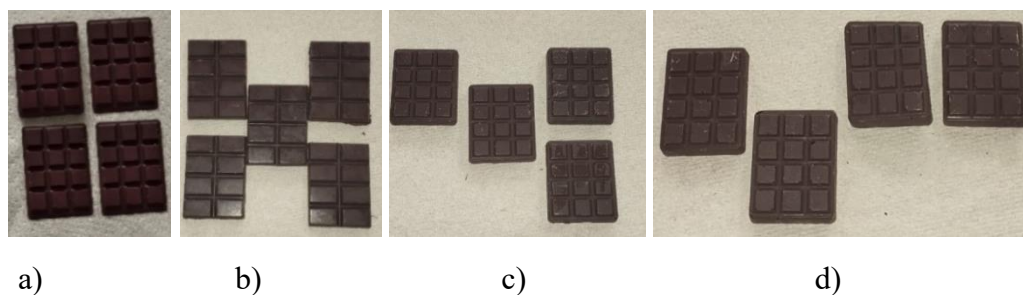
y un mecanismo de difusión Fick en cápsulas de eugenol con goma arábiga y proteína de quinua usando coacervación compleja al evaluar el comportamiento de liberación simulando diferentes sistemas alimentarios como acuoso, ácido, alcohólico y oleoso, además se determinó a partir del modelo de primer orden que la liberación de eugenol dependía del gradiente de concentración. Sun *et al.*, también reportó un comportamiento similar durante la cuantificación de carvacrol en sistemas alimentarios oleosos de microencapsulados con goma arábiga y aislado de proteínas de harina de nuez (Sun *et al.*, 2022). Esta tendencia, puede relacionarse con la morfología de las microcápsulas, la cual, pueden influir directamente en la liberación e inserción de las sustancias centrales de las microcápsulas en el medio, la hermeticidad e integridad de la pared de revestimiento que influye con la difusión gradual de compuestos (Shaddel *et al.*, 2018). Además, se observó que la liberación del componente bioactivo encapsulado está influenciada por el tipo de sistema alimentario y la concentración a la cual es añadido, como puede apreciarse en la Figura 2, hay una relación inversamente proporcional entre la cantidad de cápsulas añadidas al chocolate y la cantidad total de polifenoles cuantificada. No obstante, existen pocas investigaciones relacionadas con la cuantificación de compuestos bioactivos encapsulados en sistemas coacervados dentro de una matriz alimentaria.

5.1.5 Cuantificación de polifenoles totales en chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábiga obtenidas por secado por aspersión

De igual manera, se formularon chocolates enriquecidos con cápsulas obtenidas mediante secado por aspersión, siguiendo los balances y metodologías descritas previamente, lo cual dio como resultado las barras de chocolate mostradas en la Figura 3.

Figura 3

Formulaciones de chocolate enriquecido con cápsulas de goma arábica obtenidas por secado por aspersión



Nota. Concentraciones de las formulaciones a) chocolate sin adición. b) 28 mgEAG/gmc. c) 32 mgEAG/gmc. d) 36 mgEAG/gmc

En la Figura 3, se aprecian las barras de chocolate obtenidas después de la adición de cápsulas de polifenoles obtenidas por secado por aspersión. Se observa que, al igual que los chocolates con cápsulas coacervadas, presentaron cambios en sus propiedades físicas, adquiriendo un tono mateado. Igualmente, se observó un aumento en la viscosidad de las formulaciones a medida que se incrementaba la cantidad de cápsulas añadidas, lo cual se asigna a una disminución en la concentración de la fase grasa libre del chocolate (Lončarević et al., 2018).

Tabla 6

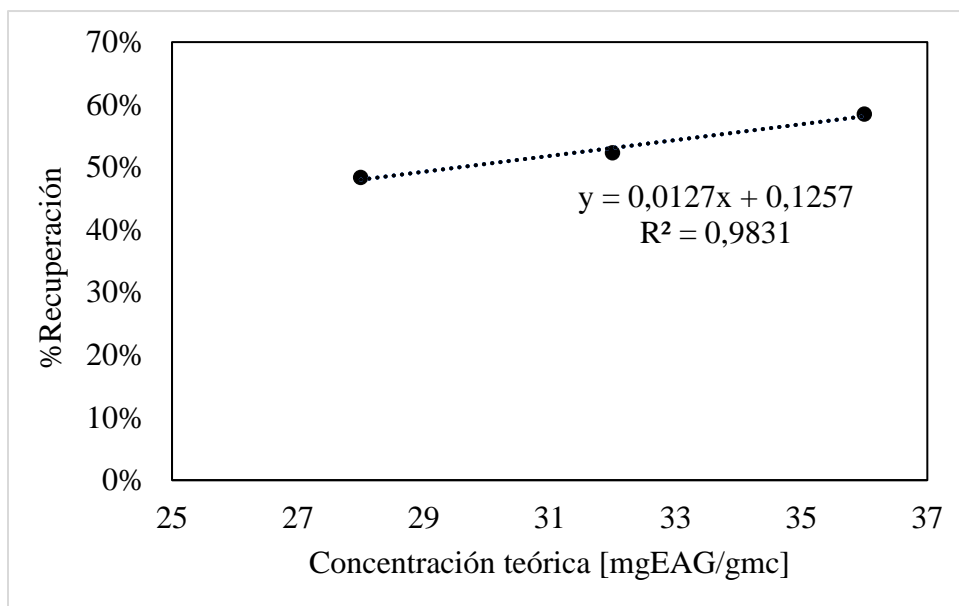
Cuantificación de chocolate enriquecido con cápsulas mediante secado por aspersión

Abreviaturas	Concentración esperada [mgEAG/gmc]	Conc. PT [mgEAG/gmc]	Prom. Concentración PT Experimental [mgEAG/gmc]	Recuperación Polifenoles*
C1	28	12,801 14,303	13,552±1,062	48,401%
C2	32	18,753 14,729	16,741±2.845	52,315%
C3	36	20,963 21,176	21,070±0,150	58,527%

* El porcentaje de recuperación de polifenoles totales hace referencia a la cantidad de polifenoles que se lograron extraer respecto a la concentración establecida para cada chocolate

Figura 4

Curva de recuperación de polifenoles de chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábiga obtenidas por secado por aspersión



Como se evidencia en la Tabla 6, se observa un comportamiento proporcional entre las concentraciones esperadas y el porcentaje de recuperación (véase Figura 4), en contraste con los chocolates enriquecidos con cápsulas por coacervación compleja. El porcentaje de recuperación de polifenoles totales para cada concentración fue diferente y no alcanzó el 100%, se obtuvo un dato menor al previamente establecido en la concentración de cada chocolate enriquecido, dando menor incluso que el chocolate sin enriquecer. Los datos determinados previamente son inferiores a lo reportado por Sik *et al.*, (Sik *et al.*, 2021) estudio en el cual obtuvieron un porcentaje de recuperación del 95% en un chocolate amargo con toronjil liofilizado, implementando una metodología de extracción convencional mediante maceración con agitación y extracción asistida con microondas como un método no convencional con cromatografía líquida de alta resolución en

fase inversa (RP-HPLC) y utilizando como compuesto modelo el ácido rosmarínico. Esta diferencia de resultados puede atribuirse a la selección de un buen método de extracción que permita extraer mayor cantidad de compuestos bioactivos; por ejemplo, realizar una extracción acuosa posee bajo rendimiento para extraer compuestos bioactivos liposolubles o con baja polaridad (Komes et al., 2013). Por otra parte, Grgić *et al.*, (Grgić et al., 2020) mencionan que los polifenoles del mismo tamaño y peso molecular no se distribuyen uniformemente en la matriz alimentaria, lo que podría obstaculizar una eficiente y precisa cuantificación de los polifenoles. En el estudio realizado por Muhammad *et al.*, (Muhammad et al., 2018), obtuvieron aumentos significativos en el contenido de polifenoles totales luego de enriquecer chocolate blanco y chocolate con leche con nanopartículas coloidales liofilizadas a partir de una combinación de goma de laca, goma xantana y extracto de canela en proporciones multinivel (0-2% p/p). Mientras que el estudio realizado por Belščak-Cvitanović *et al.*, (Belščak-Cvitanović et al., 2012) se observó que no hubo alteración en el contenido de polifenoles totales para los chocolates con leche, semidulce y oscuro enriquecidos con 1% de extracto concentrado y liofilizado de hoja de frambuesa. Sin embargo, el enriquecimiento con extracto concentrado (3%) mostró un aumento de las proantocianidinas en los tres chocolates. Para el caso de los flavon-3-oles solamente se pudo observar el aumento de la concentración mediante el ensayo de índice de vainillina propuesto por (Di Stefano et al., 1989) debido a que este tipo de compuesto polifenólico presenta alta variabilidad y diversidad estructural, por lo cual se usó un método de no selectividad o interferencias.

De acuerdo con lo anterior, se puede inferir que la técnica de encapsulamiento influye en la cantidad de polifenoles que pueden extraerse o cuantificarse en una matriz alimentaria. Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado artículos relacionados con la recuperación de polifenoles encapsulados con goma arábiga mediante secado por aspersión.

5.2 Digestión *in vitro*

5.2.1 Muestras sin matriz alimentaria (Blancos)

Para llevar un seguimiento en la liberación de polifenoles se realizó la digestión simulada a cada una de las muestras formuladas de los chocolates enriquecidos y sin enriquecer (extracto de polifenoles encapsulados, sin encapsular y la cobertura de chocolate). Este análisis tenía como objetivo evaluar cada muestra de manera individual y determinar si el enriquecimiento del chocolate con polifenoles mejora la bioaccesibilidad de este tipo de compuestos, haciendo del chocolate enriquecido una fuente rica en polifenoles y candidato a convertirse en un alimento funcional.

Tabla 7

Contenido total de polifenoles de cada muestra, sin digerir y digeridas para cada fase

Fase	Extracto de polifenoles [mgEAG/gmc]	Chocolate Boyacá [mgEAG/gmc]	Cápsulas de goma arábica CC [mgEAG/gmc]	Cápsulas de goma arábica SA [mgEAG/gmc]
Control*	90,479	26,728	13,195	12,646
Bucal	29,183± 5,197	-	-	-
Gástrica	17,443± 4,066	3,700± 0,077	8,586±2,693	5,951±0,709
Intestinal	2,616±1,382	5,690± 1,020	5,510±2,025	9,687±0,645

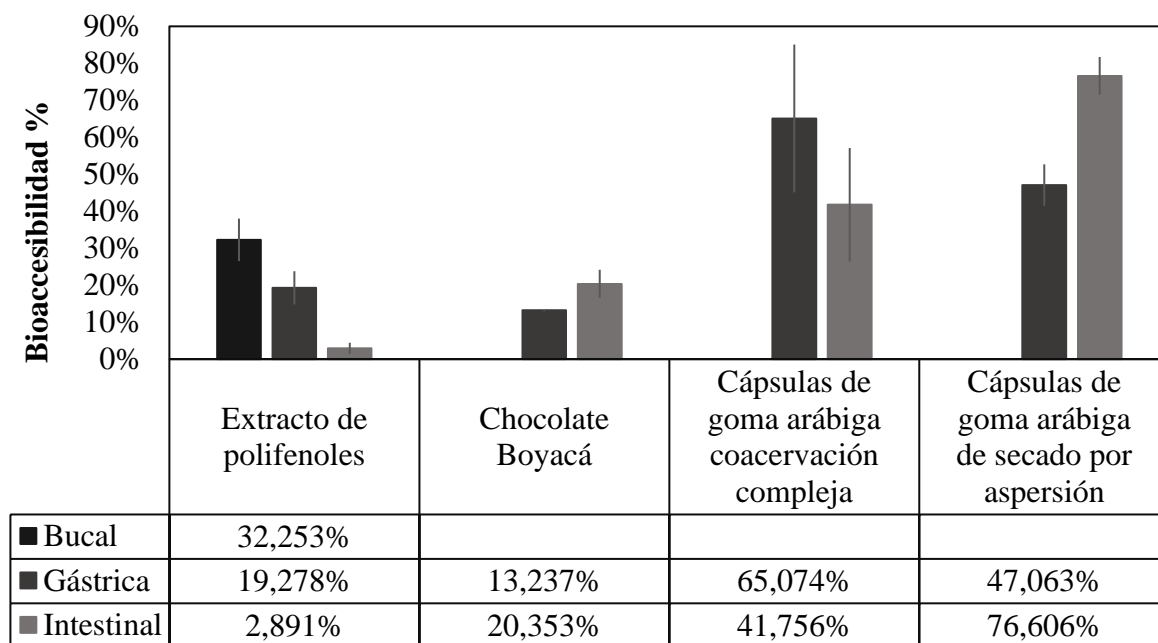
*El control hace referencia al contenido inicial de polifenoles antes de la digestión.

En la Tabla 7 se observa el contenido de polifenoles totales liberados por cada una de las muestras analizadas (matriz alimentaria, extractos libres y encapsulados). En la Figura 5 se aprecia que la bioaccesibilidad de los extractos polifenólicos sin encapsular va decreciendo conforme pasa de la fase bucal, gástrica e intestinal de 32,253%, 19,278%, 2,891%, respectivamente. Este resultado de bioaccesibilidad intestinal es similar al reportado por (Altin et al., 2018a) quienes reportaron una degradación del 97% de los compuestos polifenólicos de cascarilla de cacao

después de la digestión gastrointestinal *in vitro*. De la misma manera Nieto-Figueroa *et al.*, (Nieto-Figueroa *et al.*, 2020) obtuvieron un valor de bioaccesibilidad de 3,8% comparado con las muestras no digeridas usando el método de secado por aire forzado en las cáscaras de cacao. Este resultado es esperado puesto que, muchos de los compuestos bioactivos se metabolizan rápidamente después de la administración; también, su bioaccesibilidad está influenciada por la estructura de los polifenoles, así como de sus interacciones químicas con las soluciones simuladas en el tracto digestivo (Lippolis *et al.*, 2023). Es por esto que, se da importancia al encapsulamiento de los polifenoles, el cual otorga protección a los compuestos activos, brindando una mayor estabilidad y una liberación controlada del compuesto activo en fases digestivas.

Figura 5

Bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos para cada muestra en cada fase de digestión



La bioaccesibilidad para los polifenoles presentes en el chocolate al 100% cacao proveniente del departamento de Boyacá fue de 13,237% y 20,353% para la fase gástrica e

intestinal, respectivamente (Figura 5), se observa una tendencia creciente de bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos durante la digestión simulada. Sin embargo, estos valores son menores a lo reportado por Martini *et al.*, (Martini et al., 2018a) quienes obtuvieron una bioaccesibilidad en la fase gástrica del 31% y para la fase intestinal del 68,7 % para chocolate negro al 70%; esta diferencia de resultados puede estar sujeta a la sobreestimación de compuestos polifenólicos debido a las interferencias en el método de Folin-Ciocalteu por la presencia de azúcares en el chocolate usado por Martini *et al.* (Prior et al., 2005; Seguí et al., 2015). La diferencia de los resultados puede estar relacionados con procedimiento realizado por (Martini et al., 2018a) durante la digestión *in vitro* debido a que la destrucción mecánica de la matriz alimentaria, el tiempo de residencia en las fases gastrointestinales y la acción enzimática influye en la liberación fisicoquímica de los compuestos bioactivos de la matriz alimentaria (Paz Yépez et al., 2019).

En la digestión *in vitro* de las cápsulas de goma arábiga y gelatina mediante el método de coacervación compleja se determinaron datos de liberación de polifenoles en la fase gástrica y fase intestinal, siendo de 8,586 y 5,510 mgEAG/gE, respectivamente. La bioaccesibilidad intestinal de las cápsulas fue de 41,756%, inferior a lo reportado por Jin *et al.*, (Jin et al., 2022) quienes registraron una bioaccesibilidad de 84,23% al encapsular galato de epigallocatequina, un compuesto polifenólico del té, empleando coacervación compleja usando goma arábiga y zeína como materiales de recubrimiento. La bioaccesibilidad presentó una tendencia decreciente de los polifenoles de la fase gástrica e intestinal, comportamiento que fue observado por Mendoza Hurtado (Mendoza Hurtado, 2023). donde se menciona que estas cápsulas tienden a romperse con mayor facilidad debido a la falta de reticulación de las micropartículas con agentes reticulantes. Autores como Rojas Moreno (Rojas Moreno, 2018) sugiere que, para mejorar la protección de los

compuestos bioactivos, se pueden emplear agentes reticulantes como la enzima transglutaminasa en la encapsulación por coacervación compleja.

En la Tabla 7 se muestran los resultados de bioaccesibilidad de las cápsulas producidas por secado por aspersión usando goma arábica producidas por secado por aspersión; se observa que, la liberación de compuestos polifenólicos exhibió una tendencia creciente, contrario a las cápsulas obtenidas por coacervación compleja, dando como resultado en la fase gástrica e intestinal un contenido de polifenoles liberado de 5,951 y 9,687 mgEAG/gE para la fase gástrica e intestinal, respectivamente, con una bioaccesibilidad al final de la digestión de 76,606 %, este resultado es similar al presentado por Martínez Cifuentes (Martínez Cifuentes, 2017), quien reportó un aumento de compuestos polifenólicos después de cada fase y una bioaccesibilidad en la fase intestinal del 80% para microencapsulados de pulpa de mortiño con goma arábica y maltodextrina mediante secado por aspersión.

Los resultados anteriores indican que la bioaccesibilidad de los encapsulados elaborados por coacervación compleja es 14 veces superior a la obtenida para el extracto de polifenoles liofilizado y mediante secado por aspersión es 26 veces superior en comparación con el extracto liofilizado sin encapsular. Esto reafirma que el encapsulamiento logra proteger los compuestos bioactivos ante las condiciones gastrointestinales simuladas. Por otro lado, se observó una mayor bioaccesibilidad de polifenoles en las cápsulas elaboradas con goma arábica obtenidas por secado por aspersión comparadas con las cápsulas por coacervación compleja; estas diferencias en la liberación de los compuestos polifenólicos puede estar relacionada con la morfología de las cápsulas obtenidas, debido a que las cápsulas obtenidas mediante coacervación compleja pueden exhibir una forma irregular y porosas, mientras que las cápsulas obtenidas mediante secado por

aspersión pueden presentar una forma esférica y menos porosa facilitando su disrupción (Altuntas et al., 2023).

5.2.2 Diferencias sobre las concentraciones liberadas y porcentajes de bioaccesibilidad de formulaciones de chocolates enriquecidos con extractos encapsulados y sin encapsular

Para determinar las diferencias en el contenido de polifenoles totales y la bioaccesibilidad, entre las concentraciones de las formulaciones y el tipo de formulación, se analizaron los resultados obtenidos del método de Folin-Ciocalteu antes y después de la digestión simulada, en las muestras de chocolates enriquecidos con extractos, encapsulados y sin encapsular. Los resultados del contenido de compuestos polifenólicos en la fase intestinal para chocolates enriquecidos con extractos encapsulados no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las concentraciones a 28, 32 y 36 mgEAG/gmc; sin embargo existen diferencias significativas en relación al tipo de formulación (chocolate enriquecido con polifenoles, cápsulas de goma arábica por coacervación compleja y cápsulas de goma arábica mediante secado por aspersión), como se observa en el (Apéndice D). Para los resultados de bioaccesibilidad en la fase intestinal, se observó en el análisis de varianza ANOVA (Apéndice D) que entre las concentraciones de las formulaciones y el tipo de formulaciones existen diferencias significativas $p < 0,05$.

5.2.2.1 Chocolate enriquecido con polifenoles liofilizados sin encapsular. En la Tabla 8 se presenta el contenido de compuestos polifenólicos liberados en cada fase de digestión para los chocolates enriquecidos con polifenoles liofilizados a diferentes concentraciones. Al finalizar la fase gástrica, se observó un aumento del 53,781%, 63,541% y 80,766% en el contenido total de compuestos polifenólicos liberados, en comparación con los chocolates no enriquecidos digeridos; obteniéndose resultados de bioaccesibilidad de 20,356%, 21,648% y 23,928% (Figura 6) para las tres diferentes concentraciones evaluadas respectivamente. En la fase intestinal, se observó un

aumento de 74,357%, 66,619% y 47,157% y una bioaccesibilidad de 35,487%, 33,912%, 29,951% (Figura 6), para las concentraciones previamente mencionadas, en comparación con los chocolates no enriquecidos digeridos. Para la fase gástrica se evidencia una tendencia creciente en la bioaccesibilidad conforme aumenta la concentración formulada en la barra de chocolate; por el contrario, para la fase intestinal se exhibió una disminución de la bioaccesibilidad a medida que aumenta las concentraciones de las formulaciones.

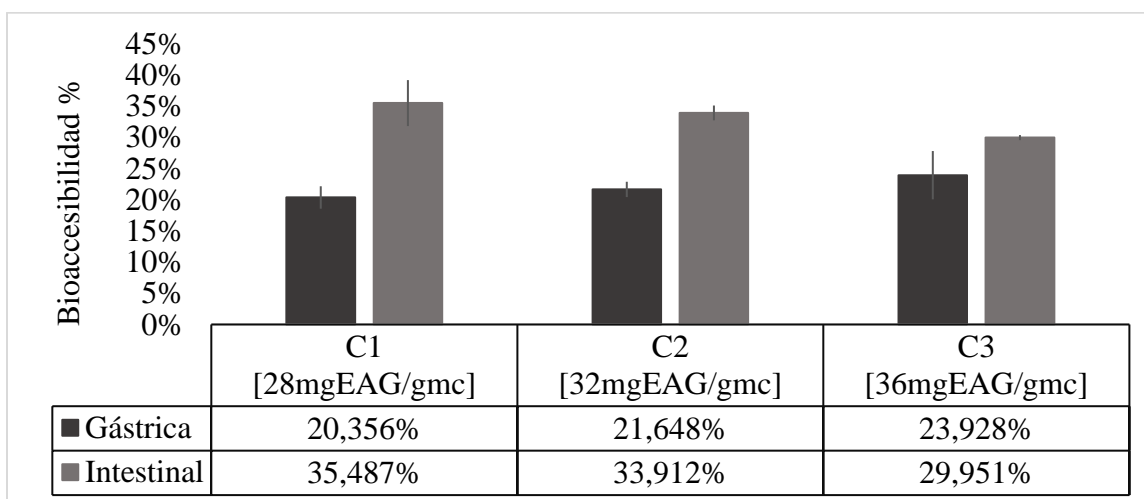
Tabla 8

Contenido total de polifenoles en chocolates enriquecidos con extractos liofilizados sin encapsular, en cada una de las fases de la digestión gastrointestinal in vitro

Fase	C1 [28 mgEAG/gmc]	C2 [32 mgEAG/gmc]	C3 [36 mgEAG/gmc]
Control	28,959±0,000	33,414±1,150	37,423±0,557
Bucal	-	-	-
Gástrica	5,895±0,521	7,234±0,410	8,955±1,449
Intestinal	10,277±1,067	11,332±0,397	11,209±0,152

Figura 6

Bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos en chocolate enriquecidos con extractos liofilizado sin encapsular, en cada una de las fases de digestión gastrointestinal in vitro



Estos resultados son diferentes a los reportados por Martini *et al.*, (Martini et al., 2018a) quienes reportaron datos de bioaccesibilidad 26,5% y 20,1% para la fase gástrica. Por otro parte, para la fase intestinal los resultados reportados son 68,2 % y 40,1%, para chocolates oscuros al 70% enriquecidos con 2% de hojas de té verde Sakura y 8% de cúrcuma en polvo, respectivamente. Por otro lado, los datos en el presente trabajo son menores a los reportados por Pinto *et al.*, (Pinto et al., 2023), donde la bioaccesibilidad en la fase gástrica e intestinal fue de 56,31% y 93,50%, respectivamente, para galletas enriquecidas con 1,77% de extracto liofilizado de cáscara de castaña. La diferencia en los resultados puede estar relacionada con la interacción entre los componentes bioactivos y los elementos presentes en la matriz alimentaria, lo que puede influir en la bioaccesibilidad de los compuestos (Sengul et al., 2014).

El aumento de la bioaccesibilidad de los extractos polifenólicos liofilizados puede estar relacionada con el contenido de grasa en la matriz alimentaria debido a que protege los polifenoles durante la digestión duodenal debido a que parece favorecer la incorporación de polifenoles en la fase lipídica (Ortega et al., 2009). Es importante destacar que, la adición de polifenoles en la matriz alimentaria influye en la bioaccesibilidad de los componentes activos, esto concuerda con el estudio realizado por Poliński *et al.*, (Poliński et al., 2021), quienes obtuvieron datos de bioaccesibilidad de 89,06%, 96,65% y 95,35% para chocolates enriquecidos con un 5% de extractos de bayas de sauco, flores de saúco y aronias, respectivamente; comparado con un resultado de bioaccesibilidad de 83,76% para chocolate sin enriquecer. Sin embargo, no se encontraron estudios que evaluaran el efecto de la concentración en la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos presentes en una matriz alimentaria.

5.2.2.2 Chocolate enriquecido con cápsulas de goma arábica obtenidas por secado por aspersión y coacervación compleja. En la Tabla 9, se muestran las concentraciones obtenidas para cada una de las fases gastrointestinales, usando diferentes chocolates enriquecidos con cápsulas obtenidas por coacervación y secado por aspersión, usando goma arábica como agente encapsulante.

Tabla 9

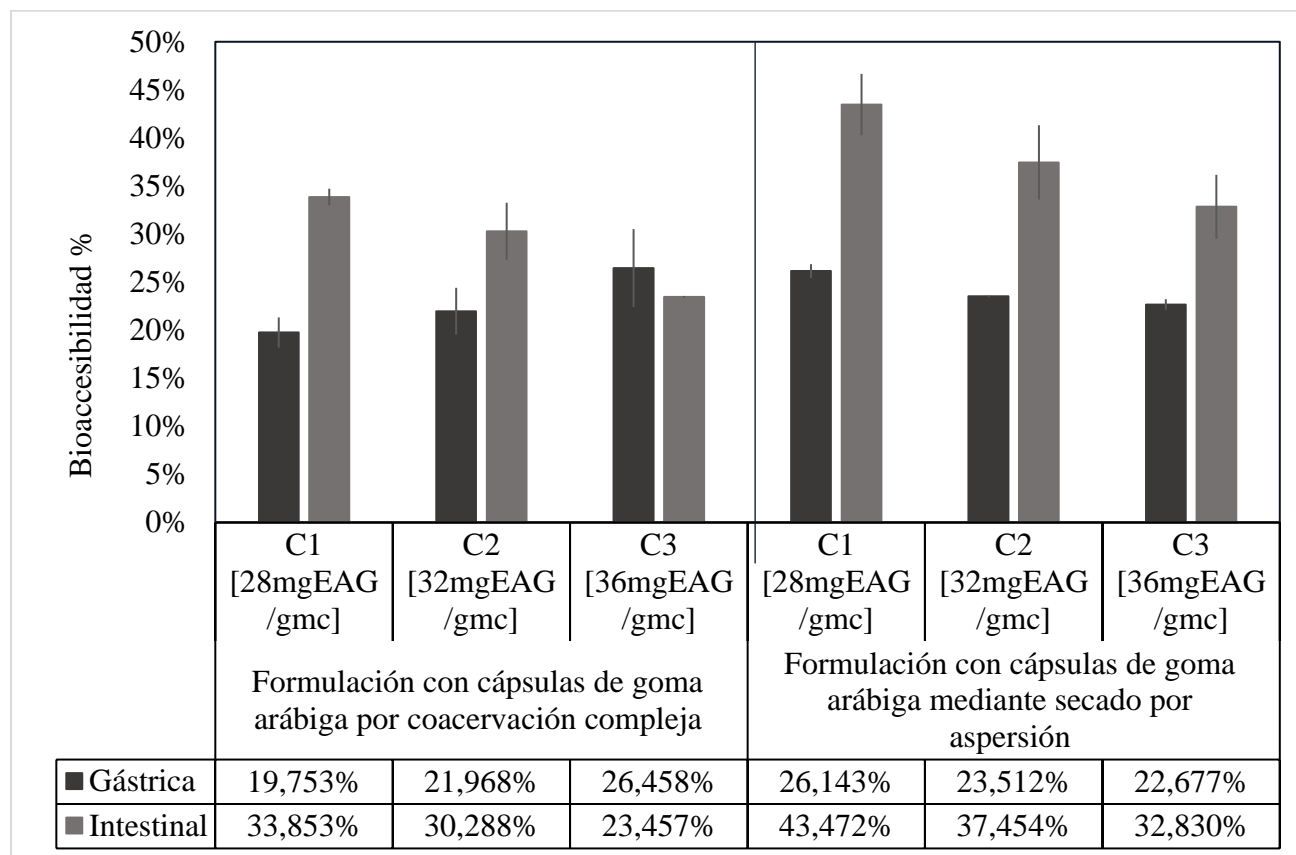
Contenido total de polifenoles totales de chocolates enriquecidos con cápsulas obtenidas por coacervación compleja y secado por aspersión usando goma arábica como agente encapsulante

Formulación con cápsulas obtenidas por coacervación compleja			
Fase	C1 [28 mgEAG/gmc]	C2 [32 mgEAG/gmc]	C3 [36 mgEAG/gmc]
Control*	28	32	36
Bucal	-	-	-
Gástrica	5,531±0,442	7,030±0,780	9,525±1,459
Intestinal	9,479±0,243	9,692±0,949	8,444±0,037
Formulación con cápsulas obtenidas mediante secado por aspersión			
Control*	28	32	36
Bucal	-	-	-
Gástrica	7,320±0,202	7,524±0,005	8,164±0,197
Intestinal	12,172±0,894	11,985±1,236	11,819±1,198

*Hace referencia a la concentración inicial de las barras de chocolate enriquecidas.

Figura 7

Bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos para chocolate enriquecido con cápsulas obtenidas por coacervación compleja y mediante secado por aspersión usando goma arábica como agente encapsulante



En la Tabla 9 se presentan las concentraciones de polifenoles totales liberados para las concentraciones establecidas de chocolates enriquecidos con goma arábica y gelatina por coacervación compleja. En comparación con el chocolate sin enriquecer, se observó un aumento de bioaccesibilidad intestinal del 59,03%, 42,28% y 10,19% para las concentraciones de 28, 32 y 36 mgEAG/gmc, respectivamente. Los datos de bioaccesibilidad reportados para el chocolate con adición de cápsulas coacervadas son menores comparado con lo reportado por Ayar-Sumer *et al.*, (Ayar-Sumer et al., 2024) quienes obtuvieron bioaccesibilidades de 79,92%, 75,41%, 223,46% y

32,54% para bebidas de chocolate caliente y fría, leche descremada pasteurizada y jugo de manzana pasteurizado, respectivamente, enriquecidos con encapsulados de extracto de zanahoria negra por coacervación compleja usando como agentes encapsulantes maltodextrina, goma arábiga y aislado de proteína de suero. Este estudio confirma la influencia de la matriz alimentaria en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos.

Por otra parte, en la Tabla 9 se reporta los datos de liberación de polifenoles obtenidos para el chocolate enriquecido con cápsulas de goma arábiga mediante secado por aspersión. La bioaccesibilidad de estas formulaciones se presentan en la Figura 7, donde se observó un incremento de 100,04%, 75,94% y 54,22% para las concentraciones C1, C2, C3 de chocolate enriquecido, respectivamente, en comparación con el chocolate sin enriquecer. La bioaccesibilidad del chocolate con adición de cápsulas mediante secado por aspersión presentó resultados superiores cuando se comparan con los reportados por Papillo *et al.*, (Papillo et al., 2019), quienes registraron una bioaccesibilidad de 9% para la matriz de arroz y para el yogur del 1,3%, al formular estas dos matrices alimentarias con encapsulados de oleoresina de cúrcuma empleando secado por aspersión con goma arábiga y maltodextrina. Esta diferencia entre los resultados puede deberse a que el yogur es una matriz más compleja al ser un alimento lácteo con grasa, lo cual podría ocasionar una menor liberación de compuestos bioactivos. Además, la interferencia de la proteína de la leche podría haber impedido la determinación precisa de polifenoles (Komes et al., 2013).

En el comportamiento de la bioaccesibilidad de los chocolates enriquecidos con cápsulas obtenidas mediante secado por aspersión, y coacervación compleja, se observó una tendencia predominante del comportamiento de bioaccesibilidad de las cápsulas evaluadas sin matriz alimentaria sobre el comportamiento observado en el chocolate sin enriquecer que se usa como matriz alimentaria. Lo anterior muestra una interacción favorable entre los componentes de las

formulaciones sobre la bioaccesibilidad. Los resultados obtenidos previamente para la bioaccesibilidad podrían deberse a que los compuestos polifenólicos interactúan con otras macromoléculas como las proteínas, los lípidos, fibras dietarias, y los polisacáridos, lo cual influye en la liberación de compuestos bioactivos y consecuentemente en la bioaccesibilidad. No obstante, las grasas pueden afectar positivamente la bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos debido a la posible micelarización en el intestino delgado (Grgić et al., 2020). Asimismo, Asenjo (Asenjo, 2016) indica que la fibra dietaria puede estar ligada a los compuestos polifenólicos, impidiendo su total liberación de la matriz alimentaria. Es probable que no todos los compuestos polifenólicos se liberen debido a su tamaño molecular o las interacciones con otros compuestos, como menciona Lippolis *et al.*, (Lippolis et al., 2023) quienes sugieren que la bioaccesibilidad está influenciada por factores como la estructura e interacciones químicas de los compuestos bioactivos. Además, mencionan que los polifenoles pequeños, es decir, polifenoles simples, pueden absorberse directamente en el intestino delgado, mientras que los polifenoles complejos no se digieren hasta llegar al intestino grueso. Según Grgić et al., (Grgić et al., 2020) sólo entre el 5% y 10% de los compuestos polifenólicos ingeridos a través de alimentos se absorben, debido que estos compuestos están principalmente en forma polar. Algo similar describe Laguerre *et al.*, (Laguerre et al., 2009) quien habla de la paradoja polar, la cual sugiere que los compuestos antioxidantes apolares son más activos en medios emulsionados que sus homólogos polares. Sin embargo, señalan que no todos los antioxidantes muestran el mismo comportamiento anteriormente descrito y que la ubicación de este en la emulsión es relevante para su eficacia.

Otra posible razón para los resultados observados en los chocolates enriquecidos con cápsulas podría ser la baja efectividad de las sales biliares para retirar los compuestos de las grasas, debido a que la grasa facilita la micelarización y protege a los polifenoles durante el proceso

gastrointestinal, es por esto que Paz Yépez (Paz Yépez, 2019) sugiere que el pH óptimo para activar las sales biliares y promover el transporte de productos desde los lípidos hasta el fluido intestinal es pH (6). Como la fase intestinal en el proceso desarrollado siempre se mantuvo en un pH de $7 \pm 0,1$; es posible que no se retirara todo el contenido de compuestos bioactivos de las micelas del chocolate.

No obstante, no se encontraron estudios que analizaran el efecto de la concentración sobre la bioaccesibilidad de chocolates enriquecidos con polifenoles encapsulados con goma arábica mediante secado por aspersión y coacervación compleja. Por otro lado, se puede afirmar que la goma arábica es un buen material de pared que favorece la protección de los polifenoles en el proceso gastrointestinal, permitiendo que gran parte de los compuestos bioactivos permanezcan sin desnaturalizarse o metabolizarse hasta llegar a la fase intestinal, donde son útiles para el organismo. Así, el enriquecimiento de matrices alimentarias comunes puede transformarse en alimentos nutracéuticos que permite que las personas puedan consumir algo beneficioso para el organismo.

5.3. Evaluación de la capacidad antioxidante

5.3.1 *Variación de la capacidad antioxidante*

Para determinar la variación de la capacidad antioxidante, se analizaron los resultados del ensayo ORAC antes y después de la digestión simulada, en las muestras de los blancos y chocolates enriquecidos con extractos, tanto encapsulados como sin encapsular. Los resultados de capacidad antioxidante de chocolates enriquecidos con extractos encapsulados y sin encapsular no presentaron diferencias significativas entre las concentraciones a 28, 32 y 36 mgEAG/gms y entre el tipo de formulación (chocolate enriquecido con polifenoles, cápsulas de goma arábica por

coacervación compleja y cápsulas de goma arábiga mediante secado por aspersión), debido a que $p > 0,05$ como se observa en el Apéndice D.

En la Tabla 10 se presenta la variación de la capacidad antioxidante entre las muestras no digeridas y digeridas. Los valores de capacidad antioxidante de los extractos de polifenoles extraídos de la cáscara de cacao digeridos exhiben una tendencia decreciente después de la digestión simulada, esto es similar al estudio realizado por Cheung *et al.*, (Cheung *et al.*, 2023) acerca de la evaluación de los compuestos polifenólicos y la capacidad antioxidante después de la digestión *in vitro* de extractos de nuez pecana.

Tabla 10

Capacidad antioxidante (ORAC) y porcentaje de variación de blancos

Muestra	Concentración Teórica [mgEAG/mgs]	Fase	Capacidad antioxidante [$\mu\text{molTE/g}$]	%Var
Extracto de polifenoles	90,479	Sin digerar	2343,278 \pm 76,638	-
		Intestinal	328,855 \pm 27,708	-85,966
Chocolate Boyacá	26,728	Sin digerar	750,984 \pm 11,131	-
		Intestinal	583,706 \pm 18,628	-22,274
Cápsulas por coacervación compleja	13,195	Sin digerar	439,774 \pm 20,161	-
		Intestinal	398,542 \pm 51,632	-9,376
Cápsulas mediante secado por aspersión	12,645	Sin digerar	736,721 \pm 22,702	-
		Intestinal	407,582 \pm 57,024	-44,676

En la Tabla 11 se muestran los resultados para chocolates enriquecidos con extractos polifenólicos de cáscara de cacao y la variación de chocolates enriquecidos con polifenoles antes

y después de la digestión *in vitro*, no se observa un patrón de disminución o aumento en el porcentaje de variación a medida que aumenta la concentración de extractos en las formulaciones; sin embargo, se observa una disminución de la capacidad antioxidante de chocolates enriquecidos con extractos en la fase intestinal, esto es similar a los presentado por Poliński *et al.*, (Poliński *et al.*, 2021), donde la capacidad antioxidante disminuyó entre un 30% y un 79% después de la digestión gastrointestinal para chocolates enriquecidos con extractos de bayas de saúco, flores de sauco y aronias, digeridos y sin digerir.

Tabla 11

ORAC capacidad antioxidante y porcentaje de variación de chocolates enriquecidos con extractos sin encapsular de polifenoles a concentraciones de [28, 32 y 36 mgEAG/gmc]

Concentración [mgEAG/mgs]	Fase	Capacidad antioxidante [μmolTE/g]	%Var
28,959 \pm 0,000	Sin digerir	888,663 \pm 30,062	-
	Intestinal	532,391 \pm 100,265	-40,091
33,414 \pm 1,150	Sin digerir	1117,935 \pm 131,297	-
	Intestinal	769,777 \pm 90,473	-31,143
37,423 \pm 0,557	Sin digerir	1367,047 \pm 195,445	-
	Intestinal	644,262 \pm 5,755	-52,872

En la Tabla 12 se muestran los resultados obtenidos de capacidad antioxidante de chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica por coacervación compleja y mediante secado por aspersión, respectivamente. Se observa una disminución en la capacidad antioxidante a medida que aumenta la concentración en las formulaciones de chocolates, esto es similar a lo reportado por Altin *et al.*, (Altin *et al.*, 2018b) donde se evidencia una disminución del 58,88% de

la capacidad antioxidante para Ayran (bebida a base de yogurt) con liposomas recubiertos de quitosano que contienen extractos polifenólicos de residuos de cáscara de cacao mediante secado por aspersión. Por otra parte, en un estudio realizado por Ayar-Sumer *et al.*, (Ayar-Sumer *et al.*, 2024) se evidencia el efecto de la matriz alimentaria en la capacidad antioxidante en las formulaciones de extractos de zanahoria negra encapsulados por coacervación compleja en maltodextrina, aislado de proteína de suero y goma arábica, así mismo, como la disminución de la capacidad antioxidante en la fase intestinal. Las diferencias en los resultados pueden estar relacionadas con la composición de las matrices alimentarias y las interacciones en el sistema de digestión simulada *in vitro*. Sin embargo, no se encontraron estudios que evaluaran el efecto de la concentración en la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos encapsulados presentes en una matriz alimentaria.

Tabla 12

Capacidad antioxidante (ORAC) y porcentaje de variación de chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica por coacervación compleja y secado por aspersión a concentraciones formuladas

Formulaciones con cápsulas de goma arábica por coacervación compleja			
Concentración [mgEAG/mgs]	Fase	Capacidad antioxidante [μ molTE/g]	%Var
28	Sin digerir	475,601 \pm 143,242	-
	Intestinal	504,543 \pm 11,780	6,085
32	Sin digerir	608,118 \pm 128,432	-
	Intestinal	404,928 \pm 53,976	-33,413
36	Sin digerir	699,633 \pm 5,980	-
	Intestinal	327,576 \pm 74,732	-53,179
Formulaciones con cápsulas de goma arábica mediante secado por aspersión			
Concentración [mgEAG/mgs]	Fase	Capacidad antioxidante [μ molTE/g]	%Var
28	Sin digerir	559,774 \pm 25,594	-
	Intestinal	473,451 \pm 29,622	-15,421
32	Sin digerir	735,408 \pm 20,444	-
	Intestinal	421,877 \pm 5,423	-42,634
36	Sin digerir	770,072 \pm 23,466	-
	Intestinal	431,034 \pm 34,825	-44,027

5.3.2 Correlación de la capacidad antioxidante

Tabla 13

Coefficientes de correlación Pearson de contenido total de polifenoles y capacidad antioxidante de las muestras no digeridas y las muestras de la fase intestinal

Coefficiente Correlación Pearson	
No digeridos	0,882
Fase intestinal	0,353

Se presentó una correlación directa y positiva del contenido total de polifenoles con la capacidad antioxidante, un comportamiento contrario a lo presentado por Cavia *et al.*, (Cavia et al., 2023) quienes registraron un valor de 0,3889 para los no digeridos y un valor de 0,5995 para la fase gastrointestinal donde se analiza la relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante de sidras españolas. Los coeficientes presentados en la Tabla 13 indican que la correlación es mayor para los no digeridos que para la fase intestinal, lo que implica que la digestión afecta de manera negativa la relación. Al mismo tiempo, Ma *et al.*, (Ma et al., 2021) asegura que los compuestos liberados juegan un papel importante en el potencial antioxidante de las muestras después de la digestión, y se debe a que los antioxidantes apolares son más activos que sus homólogos polares en medios emulsionados (Laguerre et al., 2009). Además, es posible que durante la digestión algunas de las formas diméricas (prociánidinas) y oligómeras (trímeros y tetrámeros) se hayan hidrolizado a sus formas simples catequina y epicatequina, las cuales podrían tener menor capacidad antioxidante en esta matriz rica en composición lipídica. Según Kratchanova *et al.*, (Kratchanova et al., 2010) el tipo de solvente influye en la eficiencia de extracción de antioxidantes y por consiguiente en el potencial de estos para inhibir los radicales libres. De la misma manera Cavia *et al.*, (Cavia et al., 2023) afirma que la correlación del contenido de polifenoles y la actividad antioxidante dependerá de la matriz alimentaria.

6. Conclusiones

- El método de extracción utilizado para las formulaciones de chocolate con adición de polifenoles sin encapsular es eficaz para extraer los compuestos polifenólicos de la matriz alimentaria. No obstante, los chocolates con adición de cápsulas obtuvieron un bajo porcentaje de recuperación de compuestos bioactivos, por lo cual el método de extracción no es eficiente para este tipo de formulación.

- El chocolate con adición de polifenoles encapsulados mediante secado por aspersión obtuvo el mejor porcentaje de bioaccesibilidad (43,472%) para la concentración de 28 mgEAG/gmc (incremento de 100% en comparación con el chocolate sin enriquecer). Asimismo, se obtiene una bioaccesibilidad mayor para chocolates enriquecidos con cápsulas, ya sean coacervadas u obtenidas mediante secado por aspersión a una concentración de 28 mgEAG/gmc en comparación al chocolate enriquecido con polifenoles sin encapsular a concentraciones mayores.
- El contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante están relacionadas de manera directa, donde la digestión *in vitro* y la matriz alimentaria influye en la capacidad antioxidante lo que disminuye la efectividad de los compuestos al liberarse en la fase intestinal.

7. Recomendaciones

- Se sugiere evaluar el comportamiento de liberación y bioaccesibilidad de compuestos polifenólicos encapsulados en matrices alimentarias con diferentes contenidos de grasa.
- Se recomienda realizar un estudio sobre la influencia de la morfología de los encapsulados en la liberación de compuestos polifenólicos en una matriz alimentaria.
- Se insta a estudiar la interacción de los compuestos polifenólicos con otros compuestos bioactivos presentes en la matriz alimentaria.
- Se sugiere analizar el porcentaje de recuperación de compuestos polifenólicos encapsulados en matrices alimentarias haciendo uso de otros agentes de extracción.

Referencias bibliográficas

- Altin, G., Gültekin-Özgülven, M., & Ozcelik, B. (2018a). Chitosan coated liposome dispersions loaded with cacao hull waste extract: Effect of spray drying on physico-chemical stability and in vitro bioaccessibility. *Journal of Food Engineering*, 223, 91–98.
- Altin, G., Gültekin-Özgülven, M., & Ozcelik, B. (2018b). Liposomal dispersion and powder systems for delivery of cocoa hull waste phenolics via Ayran (drinking yoghurt): Comparative studies on in-vitro bioaccessibility and antioxidant capacity. *Food Hydrocolloids*, 81, 364–370. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2018.02.051>
- Altuntas, U., Altin-Yavuzarslan, G., & Ozçelik, B. (2023). Enhanced Oxidative Stability and Bioaccessibility of Sour Cherry Kernel Byproducts Encapsulated by Complex Coacervates with Different Wall Matrixes by Spray- and Freeze-Drying. *ACS Omega*, 8(26), 23782–23790. https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.3C02128/ASSET/IMAGES/LARGE/AO3C02128_0006.JPEG
- Andrés Andrés, & Alicia. (2019). Desarrollo de un sistema de digestión in vitro para la determinación de la bioaccesibilidad de componentes bioactivos.
- Andrews, H. E. (2012). Estudio de las propiedades térmicas de muestras comerciales de goma arábica en función de la actividad de agua.
- Asenjo, G. A. R. (2016). Determinación de bioaccesibilidad de polifenoles en murta fresca y jugo de murta (*Ugni molinae Turcz.*).
- Ayar-Sumer, E. N., Nyambe, C., Hashim, M. A., Altin-Yavuzarslan, G., El-Messery, T. M., & Ozçelik, B. (2024). Optimizing encapsulation of black carrot extract using complex

coacervation technique: Maximizing the bioaccessibility and release kinetics in different food matrixes. *LWT*, 198, 115995. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2024.115995>

Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Benković, M., Karlović, S., Hečimović, I., Ježek, D., & Bauman, I. (2012). Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Research International*, 48(2), 820–830.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.06.023>

Cardoso de Souza, B. V., de Moraes Sousa, M., Augusto Gasparotto Sattler, J., Cristina Sousa Gramoza Vilarinho Santana, A., Bruno Fonseca de Carvalho, R., de Sousa Lima Neto, J., de Matos Borges, F., Angelica Neri Numa, I., Braga Ribeiro, A., & César Cunha Nunes, L. (2022). Nanoencapsulation and bioaccessibility of polyphenols of aqueous extracts from *Bauhinia forficata* link. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100144.
<https://doi.org/10.1016/J.FOCHMS.2022.100144>

Castillo, E., Alvarez, C., & Contreras, Y. (2018). Caracterización fisicoquímica de la cáscara del fruto de un clon de cacao (*Theobroma cacao* L.) cosechados en Caucagua estado Miranda, Venezuela. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=376160247008>

Cavia, M. M., Arlanzón, N., Busto, N., Carrillo, C., & Alonso-Torre, S. R. (2023). The impact of *in vitro* digestion on the polyphenol content and antioxidant activity of Spanish Ciders. *Foods*, 12(9), 1861.

Chen, K., Zhang, M., Mujumdar, A. S., & Wang, H. (2021). Quinoa protein-gum Arabic complex coacervates as a novel carrier for eugenol: Preparation, characterization and application for

minced pork preservation. *Food Hydrocolloids*, 120, 106915.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2021.106915>

Cheung, M., Robinson, J. A., Greenspan, P., & Pegg, R. B. (2023). Evaluating the phenolic composition and antioxidant properties of Georgia pecans after in vitro digestion. *Food Bioscience*, 51, 102351. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102351>

Delfanian, M., & Sahari, M. A. (2020). Improving functionality, bioavailability, nutraceutical and sensory attributes of fortified foods using phenolics-loaded nanocarriers as natural ingredients. *Food Research International*, 137, 109555. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109555>

Di Stefano, R., Cravero, M. C., & Gentilini, N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *Enotecnico*, 25.

Díaz Ponce, M. A., Cervantes Molina, X. P., & Chesme Rios, C. L. (2023). Sostenibilidad en el Cultivo de Cacao (*Theobroma Cacao* L.) Por las Oportunidades de Economía Circular para la Provincia los Ríos. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(4), 5182–5197. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i4.7342

Didar, Z. (2024). Characterization of white chocolate enriched with co-encapsulated *Lactobacillus acidophilus* (La-5) and rose hip shell fruit extract: Characterization, probiotic viability during storage, and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Science & Nutrition*, 12(2), 890–906. <https://doi.org/10.1002/FSN3.3805>

E, S., Panjikaran, S. T., LC, S., PR, R., a, & ER, A. (2019). Health benefits of bioactive compounds from cocoa (*Theobroma cacao*). *Agricultural Reviews*, of. <https://doi.org/10.18805/ag.r-1851>

- Eghbal, N., & Choudhary, R. (2018). Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. *LWT*, 90, 254–264.
<https://doi.org/10.1016/J.LWT.2017.12.036>
- Felice, F., Fabiano, A., De Leo, M., Piras, A. M., Beconcini, D., Cesare, M. M., Braca, A., Zambito, Y., & Di Stefano, R. (2020). Antioxidant Effect of Cocoa By-Product and Cherry Polyphenol Extracts: A Comparative Study. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 132, 9(2), 132.
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX9020132>
- Feng, R., Wang, L., Zhou, P., Luo, Z., Li, X., & Gao, L. (2020). Development of the pH responsive chitosan-alginate based microgel for encapsulation of *Jughans regia* L. polyphenols under simulated gastrointestinal digestion in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 250, 116917. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2020.116917>
- Ferreira Santos, P., Ibarz, R., Fernandes, J. M., Pinheiro, A. C., Botelho, C., Rocha, C. M. R., Teixeira, J. A., & Martín-Belloso, O. (2021). Encapsulated pine bark polyphenolic extract during gastrointestinal digestion: Bioaccessibility, bioactivity and oxidative stress prevention. *Foods*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/foods10020328>
- Grassia, M. (2018). Green extraction of polyphenols from cocoa shells and microencapsulation to produce a functional chocolate bar.
https://iris.unimol.it/bitstream/11695/99047/1/Tesi_M_Grassia.pdf
- Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., & Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the Encapsulation in Bioavailability of Phenolic Compounds. *Antioxidants* 2020, Vol. 9, Page 923, 9(10), 923.
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX9100923>

- Hernández Pérez, A. B. (2020). Incorporación de compuestos bioactivos de mucílago de cacao (*Theobroma cacao* L.) y pulpa de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) en el desarrollo de chocolate blanco con propósitos funcionales.
<https://repositorio.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/73c27867-e7e5-4be9-98b1-a9538c366bbc/content>
- Huang, K., Yuan, Y., & Baojun, X. (2023). A Critical Review on the Microencapsulation of Bioactive Compounds and Their Application. En *Food Reviews International* (Vol. 39, Número 5, pp. 2594–2634). Taylor and Francis Ltd.
<https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1963978>
- Hur, S. J., Lim, B. O., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2011). In vitro human digestion models for food applications. *Food chemistry*, 125(1), 1–12.
- Jin, J., Liu, C., Tong, H., Sun, Y., Huang, M., Ren, G., & Xie, H. (2022). Encapsulation of EGCG by zein-gum Arabic complex nanoparticles and in vitro simulated digestion of complex nanoparticles. *Foods*, 11(14), 2131.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Škrabal, S., Vojvodić, A., & Bušić, A. (2013). The influence of dried fruits enrichment on sensory properties of bitter and milk chocolates and bioactive content of their extracts affected by different solvents. *LWT - Food Science and Technology*, 53(1), 360–369. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2013.02.016>
- Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., & Mihailov, A. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica*, 57(2).

Laguerre, M., Lopez Giraldo, L. J., Lecomte, J., Figueroa-Espinoza, M.-C., Baréa, B., Weiss, J.,

Decker, E. A., & Villeneuve, P. (2009). Chain length affects antioxidant properties of chlorogenate esters in emulsion: the cutoff theory behind the polar paradox. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(23), 11335–11342.

Lippolis, T., Cofano, M., Caponio, G. R., De Nunzio, V., & Notarnicola, M. (2023).

Bioaccessibility and bioavailability of diet polyphenols and their modulation of gut microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3813.

Lončarević, I., Pajin, B., Fišteš, A., Šaponjac, V. T., Petrović, J., Jovanović, P., Vulić, J., & Zarić,

D. (2018). Enrichment of white chocolate with blackberry juice encapsulate: Impact on physical properties, sensory characteristics and polyphenol content. *LWT*, 92, 458–464.

Ma, Y., Gao, J., Wei, Z., & Shahidi, F. (2021). Effect of in vitro digestion on phenolics and

antioxidant activity of red and yellow colored pea hulls. *Food Chemistry*, 337, 127606.

Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., & D'Alessandro, A.

G. (2022). Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen*, 2(2), 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>

Martínez Cifuentes, S. G. (2017). Estudio del efecto de la microencapsulación sobre la

bioaccesibilidad gástrica in vitro de compuestos bioactivos de taxo (*Passiflora Mollissima*), mora (*Rubus Glaucus Benth*) y mortiño (*Floribundum Kunth*).

<https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/17357/1/CD-7856.pdf>

Martini, S., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2018a). 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>

Martini, S., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2018b). Comprehensive evaluation of phenolic profile in dark chocolate and dark chocolate enriched with Sakura green tea leaves or turmeric powder. *Food Research International*, 112, 1–16.

<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.020>

Mendoza Hurtado, C. M. (2023). Microencapsulación y bioaccesibilidad de capsaicina obtenida del extracto de *Capsicum frutescens*.

Minekus, M., Alminger, 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 & function*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>

Minitemper. (s/f). Recuperado el 18 de mayo de 2024, de <https://www.ristorazione-refrigerazione.it/it/product-download?idProduct=35183&idTab=31>

Mounika, E., Sivamma, P., & Snehitha, R. (2021). Atomization techniques in spray drying: A Review. ~ 454 ~ *The Pharma Innovation Journal*, 5, 454–461.

<http://www.thepharmajournal.com>

Muhammad, D. R. A., Saputro, A. D., Rottiers, H., Van de Walle, D., & Dewettinck, K. (2018). Physicochemical properties and antioxidant activities of chocolates enriched with engineered cinnamon nanoparticles. *European Food Research and Technology*, 244, 1185–1202.

- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 3380, 22(7), 3380. <https://doi.org/10.3390/IJMS22073380>
- Murillo-Méndez, C. J., Molina-Velasco, D. R., López-Giraldo, L. J., & Salazar-Beleño, A. M. (2021). Evaluación de la bioaccesibilidad de cadmio en formulaciones de chocolatería por digestión gastrointestinal *in vitro*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 20(1), 68–83. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v.n.2022.1746>
- Nieto-Figueroa, K. H., Mendoza-García, N. V., Gaytán-Martínez, M., Wall-Medrano, A., Loarca-Piña, M. G. F., & Campos-Vega, R. (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.
- Origen, expansión y situación actual del cacao. (s/f). 1–23. Recuperado el 7 de febrero de 2024, de https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/13384/22784_3775.pdf?se
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M. P., Macià, A., & Motilva, M. J. (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an *in vitro* digestion model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5743–5749. <https://doi.org/10.1021/jf900591q>
- Papillo, V. A., Arlorio, M., Locatelli, M., Fuso, L., Pellegrini, N., & Fogliano, V. (2019). *In vitro* evaluation of gastro-intestinal digestion and colonic biotransformation of curcuminoids considering different formulations and food matrices. *Journal of functional foods*, 59, 156–163.

- 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>
- Paz Yépez Carolina Alicia. (2019). Influencia de factores inherentes al alimento y al individuo sobre la digestibilidad de lípidos de origen vegetal.
- Pérez, M., Dominguez López, I., & Lamuela Raventós, R. M. (2023). The Chemistry Behind the Folin-Ciocalteu Method for the Estimation of (Poly)phenol Content in Food: Total Phenolic Intake in a Mediterranean Dietary Pattern. En *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 71, Número 46, pp. 17543–17553). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c04022>
- Pico Hernández, S. M., Estévez, J. J., López Giraldo, L. J., & Murillo Méndez, C. J. (2019). Supercritical extraction of bioactive compounds from cocoa husk: Study of the main parameters. *Revista Facultad de Ingeniería*, 91, 95–105. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.n91a09>
- Pico-Hernández, S. M., Murillo-Méndez, C. J., & López-Giraldo, L. J. (2020). Extraction, separation, and evaluation of antioxidant effect of the different fractions of polyphenols from cocoa beans. *Revista Colombiana de Química*, 49(3), 19–27.
- Pinto, D., Moreira, M. M., Švarc-Gajić, J., Vallverdú-Queralt, A., Brezo-Borjan, T., Delerue-Matos, C., & Rodrigues, F. (2023). In-vitro gastrointestinal digestion of functional cookies enriched with chestnut shells extract: Effects on phenolic composition, bioaccessibility, bioactivity, and α -amylase inhibition. *Food Bioscience*, 53, 102766. <https://doi.org/10.1016/J.FBIO.2023.102766>

- Poliński, S., Kowalska, S., Topka, P., & Szydłowska-Czerniak, A. (2021). Physicochemical, Antioxidant, Microstructural Properties and Bioaccessibility of Dark Chocolate with Plant Extracts. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 5523, 26(18), 5523.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES26185523>
- Porto de Souza Vandenberghe, L., Kley Valladares-Diestra, K., Amaro Bittencourt, G., Fátima Murawski de Mello, A., Sarmiento Vásquez, Z., Zwiercheczewski de Oliveira, P., Vinícius de Melo Pereira, G., & Ricardo Soccol, C. (2022). Added-value biomolecules' production from cocoa pod husks: A review. *Bioresource Technology*, 344, 126252.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126252>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *En Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 53, Número 10, pp. 4290–4302).
<https://doi.org/10.1021/jf0502698>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*, 27(1), 76–89.
- Rojas Moreno, s. (2018). Efecto del agente reticulante en la eficiencia de encapsulación de agentes bioactivos lipofílicos por la técnica combinada coacervación compleja-secado por aspersion.
- Rojo Poveda, O., Barbosa Pereira, L., Zeppa, G., & Stévigny, C. (2020). Cocoa bean shell—a by-product with nutritional properties and biofunctional potential. *En Nutrient* (Vol. 12, Número 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12041123>

- Sánchez Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros Zevallos, L., & Jacobo Velázquez, D. A. (2013). The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990–5999. <https://doi.org/10.1039/c3ay41125g>
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary Polyphenols and the Prevention of Diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287–306. <https://doi.org/10.1080/1040869059096>
- Seguí, L., Calabuig-Jiménez, L., Betoret, N., & Fito, P. (2015). Physicochemical and antioxidant properties of non-refined sugarcane alternatives to white sugar. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(12), 2579–2588. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12926>
- Sengul, H., Surek, E., & Nilufer-Erdil, D. (2014). Investigating the effects of food matrix and food components on bioaccessibility of pomegranate (*Punica granatum*) phenolics and anthocyanins using an in-vitro gastrointestinal digestion model. *Food Research International*, 62, 1069–1079. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2014.05.055>
- Sik, B., Lakatos, E. H., Kapcsándi, V., Székelyhidi, R., & Ajtony, Z. (2021). Exploring the rosmarinic acid profile of dark chocolate fortified with freeze-dried lemon balm extract using conventional and non-conventional extraction techniques. *LWT*, 147, 111520.
- Suárez Diaz, S. A., & Mejía Alquichire, J. E. (2022). Estudio De Bioaccesibilidad De Antioxidantes Presentes Y Añadidos En Formulaciones De Chocolate Mediante Digestión Gastrointestinal In Vitro.
- Sun, J., Cheng, Y., Zhang, T., & Zang, J. (2022). Microencapsulation of Carvacrol by Complex Coacervation of Walnut Meal Protein Isolate and Gum Arabic: Preparation, Characterization

and Bio-Functional Activity. *Foods* 2022, Vol. 11, Page 3382, 11(21), 3382.

<https://doi.org/10.3390/FOODS11213382>

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.

Urbańska, B., & Kowalska, J. (2019). Comparison of the total polyphenol content and antioxidant activity of chocolate obtained from roasted and unroasted cocoa beans from different regions of the world. *Antioxidants*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/antiox8080283>

Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M. C., Martínez-Flores, H. E., & García-Pérez, M.-E. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 16, 15–29.

Vásquez, Z. S., de Carvalho Neto, D. P., Pereira, G. V. M., Vandenberghe, L. P. S., de Oliveira, P. Z., Tiburcio, P. B., Rogez, H. L. G., Góes Neto, A., & Soccol, C. R. (2019). Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review. *Waste Management*, 90, 72–83. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2019.04.030>

Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., Córdova-Ramos, J. S., Best, I., & Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. En *Polymers* (Vol. 14, Número 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14194194>

Zehiroglu, C., & Ozturk Sarikaya, S. B. (2019). The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. En *Journal of Food Science and Technology*

(Vol. 56, Número 11, pp. 4757–4774). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03952->

x

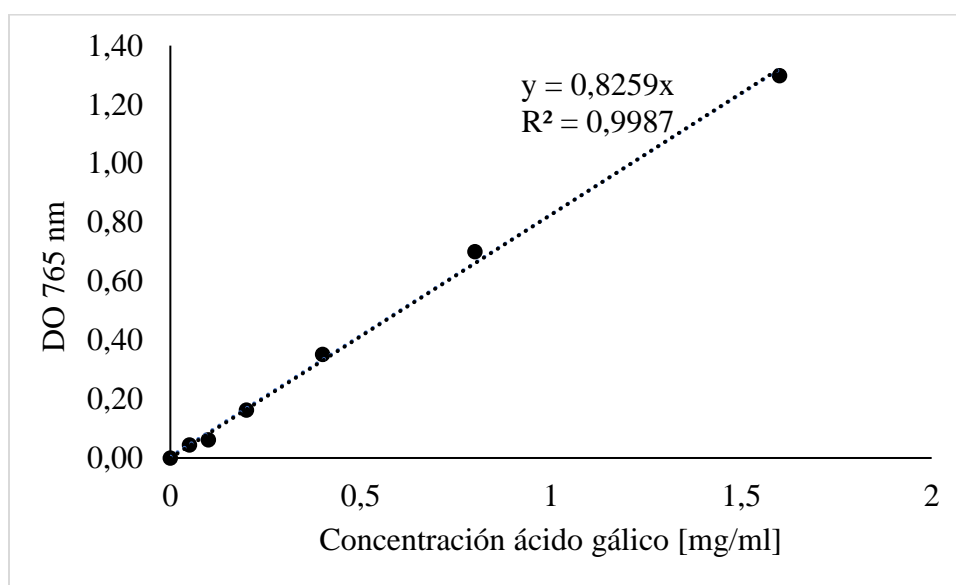
Apéndices

Apéndice A. Curva de calibración de ácido gálico

Para cuantificar el contenido de polifenoles totales, inicialmente se preparó una curva de calibración de ácido gálico (en el rango de 0-1,6 mg/mL) como se observa en la Figura A1.

Figura A1

Curva de calibración del ácido gálico



Apéndice B. Balances de masa para formulaciones de chocolates enriquecidos

La cantidad de extracto de polifenoles liofilizado sin encapsular y encapsulado por coacervación compleja y secado por aspersión a añadir para obtener las formulaciones de chocolate enriquecidos a [28, 32 y 36 mgEAG/gmc] se dedujeron a partir de los siguientes balances:

Balance global:

$$m_E = m_C + m_P \quad (\text{Ec. 3})$$

Balance de polifenoles:

$$m_E X_E = m_C X_C + m_P X_P \quad (\text{Ec. 4})$$

Masa del extracto de polifenoles liofilizados a adicionar:

$$m_P = \frac{m_E (X_E - X_C)}{(X_P - X_C)} \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde los subíndices E, C y P indican chocolate enriquecido, chocolate Boyacá y extracto de polifenoles encapsulado o sin encapsular, respectivamente, mientras que m y X indican la masa y la composición.

Tabla B1

Formulación de barras de chocolate con extractos de polifenoles por balance de masa

Masa de chocolate [g]	Concentración PT inicial [mgEAG/gmc]	Extracto de polifenoles liofilizado [g]	Concentración PT teórica [mgEAG/gmc]
80	26,728	1,596	28
60	28	3,841	32
40	32	2,736	36

Tabla B2

Formulación de barras de chocolate con extractos encapsulados con goma arábica por coacervación compleja por balance de masa

Masa de chocolate [g]	Concentración PT inicial [mgEAG/gmc]	Extracto de polifenoles encapsulados en GACC [g]	Concentración PT teórica [mgEAG/gmc]
80	26,738	10,440	28
60	28	18,189	32
40	32	12,126	36

Tabla B3

Formulación de barras de chocolate con extractos encapsulados con goma arábica mediante secado por aspersión por balance de masa

Masa de chocolate [g]	Concentración PT inicial [mgEAG/gmc]	Extracto de polifenoles encapsulados en GASA[g]	Concentración PT teórica [mgEAG/gmc]
80	26,728	8,047	28
60	28	18,980	32
40	32	12,653	36

Apéndice C. Metodologías para cuantificación de chocolate enriquecido con cápsulas

Para determinar el contenido de polifenoles totales en chocolates enriquecidos con cápsulas, se probaron diferentes metodologías, inicialmente realizaron pruebas preliminares formulando barras de chocolate con cápsulas de alginato de sodio. La metodología seleccionada se aplicó para chocolates enriquecidos con cápsulas de goma arábica. Para estimar los compuestos fenólicos con la aplicación de las diferentes metodologías se prepararon dos tipos de formulaciones. A continuación, se presentan las formulaciones realizadas, las metodologías y los resultados obtenidos:

Primera formulación

Se tomaron para 40 g de chocolate con un contenido inicial de polifenoles (20,580 mgEAG/gmc) enriquecido con 2,943 g de cápsulas de alginato de sodio (16,23 mgEAG/gmc), se estimó que el chocolate contenía (21.77 mgEAG/gmc) de polifenoles.

Segunda formulación

Para obtener 40 g de chocolate enriquecido a (30 mgEAG/gmc), se tomaron 40 g de chocolate Boyacá (26,728 mgEAG/gmc) enriquecido con 8,06 g de cápsulas de alginato de sodio (16,23 mgEAG/gmc).

Metodología 1

Para determinar el contenido de polifenoles totales presentes en las formulaciones de chocolates enriquecidos como cápsulas de alginato de sodio por coacervación compleja se siguió la metodología descrita por (Hernández Pérez, 2020) con algunas modificaciones. Al finalizar el segundo ciclo de centrifugación se eliminó el disolvente orgánico residual (hexano) y se procedió a realizar la extracción de los compuestos fenólicos empleando una solución de agua-etanol al 80%. Posteriormente, el pH de la solución se aumentó a 12 y finalmente se redujo a pH 7. Por último, las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes recolectados se filtraron. La cuantificación compuestos fenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu.

Tabla C1

Cuantificación de polifenoles totales de chocolate enriquecido con cápsulas por metodología 1, primera formulación.

Peso muestra [g]	Volumen total [ml]	DO1	DO2	DOprom	Concentración PT [mgEAG/gmc]
0,300	3,840	1,174	1,236	1,109	17,152
0,300	3,980	1,163	1,314	1,143	18,315
Concentración promedio					17,733

Metodología 2

Para determinar el contenido de polifenoles totales presentes en las formulaciones de chocolate enriquecidos con cápsulas se realizó el siguiente procedimiento por (Toro-Uribe, 2018)

con algunas modificaciones. Se pesó 1 g de chocolate molido, se añadieron 20 ml de agua-etanol (80% v/v) combinado con agitación durante 15 min a 60 °C. Luego, se añadió 1 ml de citrato de sodio (10% p/v), se aumentó el pH a 12 con una solución de NaOH (1M) y se redujo a 7 con una solución de HCl (1M) con ciclos combinados de agitación en vortex . Luego, las muestras se centrifugaron (15 min, 4°C, a 4000 rpm) y los sobrenadantes se filtraron. Por último, la cuantificación de compuestos fenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu.

Tabla C2

Cuantificación de polifenoles totales de chocolate enriquecido con cápsulas por metodología 2, primera formulación

Peso muestra [g]	Volumen total [ml]	DO1	DO2	DOprom	Concentración PT [mgEAG/gmc]
1	22,600	0,439	0,455	0,351	9,605
1	22,600	0,460	0,459	0,364	9,947
Concentración promedio					9,776

Seguidamente, se presenta la cuantificación de compuestos fenólicos de la segunda formulación, para la extracción de compuestos fenólicos de la formulación previamente mencionada, inicialmente se retiró el sobrenadante antes de aumentar el pH a 12 para estimar los compuestos fenólicos presentes, los resultados se observan en la Tabla . Por último, en la Tabla se expone la cuantificación de compuestos fenólicos aplicando la metodología 2.

Tabla C3

Cuantificación de polifenoles totales de chocolate enriquecido con cápsulas por sin cambio de pH de la segunda formulación

Peso muestra [g]	Volumen total [ml]	DO1	DO2	DO3	DOprom	Concentración PT [mgEAG/gmc]
1,010	20	0,479	0,495	0,478	0,338	9,303
1,010	20	0,495	0,503	0,502	0,404	9,686
1,006	20	0,544	0,576	0,574	0,469	11,282
1,006	20	0,645	0,594	0,603	0,518	12,469
Concentración promedio						10,685

Tabla C4

Cuantificación de polifenoles totales de chocolate enriquecido con cápsulas por metodología 2, segunda formulación

Peso muestra [g]	Volumen total [ml]	DO1	DO2	DO3	DO4	DOprom	Concentración PT [mgEAG/gmc]
1,010	21,500	0,334	0,319	0,330	0,336	0,234	6,025
1,006	21,550	0,416	0,414	0,391	0,540	0,335	8,695
1,006	21,550	0,481	0,488	0,504	0,513	0,401	10,388
Concentración promedio							8,369

Metodología 3

Para la cuantificación de polifenoles totales se siguió el procedimiento descrito por (Grassia, 2018) con algunas modificaciones. Se pesaron 1 g de chocolate enriquecido con cápsulas molido en un tubo Falcon (15 ml). La grasa se extrajo tres veces con 5 ml de n-hexano mediante agitación en vortex durante 3 min y se centrifugaron (15 min, 17 °C, 5000 rpm). Los compuestos fenólicos se extrajeron de las muestras secas y desgrasadas con 20 mL de etanol/agua (80% v/v) con agitación por 15 min. Por último, se añadió 1 ml de citrato de sodio (10% p/v), se aumentó el pH a 12 con una solución NaOH (2M) con ciclos combinados de agitación en vortex. Luego, las muestras se centrifugaron (15 min, 4°C, a 4000 rpm), los sobrenadantes se filtraron y los

compuestos fenólicos se determinaron por el método de Folin- Ciocalteu. Los resultados obtenidos de aplicar la metodología descrita se presentan en la Tabla .

Tabla C5

Cuantificación de polifenoles totales de chocolate enriquecido con cápsulas por metodología 3, primera formulación

Peso muestra [g]	Volumen total [ml]	DO1	DO2	DOprom	Concentración PT [mgEAG/gms]
1	10,430	0,717	0,784	0,655	8,265
1	11,030	0,419	0,447	0,337	4,501
Concentración promedio					6,383

Metodología 4

Para determinar el contenido de polifenoles totales se siguió el procedimiento descrito por (Didar, 2024) con algunas modificaciones. Se pesaron 0,5 g de chocolate molido y se desengrasaron con 50 ml de n-hexano a temperatura ambiente durante 30 min. Posterior a la evaporación del disolvente residual durante 24 h, se realizó la extracción mezclando 2,0 g de muestras desengrasadas con 10 ml de acetona-agua-ácido acético en una proporción igual a 70:29.8:0.2 v/v/v , con agitación durante 30 min. Las extracciones se realizan dos veces a temperatura ambiente.

Tabla C6

Cuantificación de polifenoles totales de chocolate enriquecido con cápsulas por metodología 4, segunda formulación

Peso muestra [g]	Volumen total [ml]	DO1	DO2	DO3	DOprom	Concentración PT [mgEAG/gmc]
-------------------------	---------------------------	------------	------------	------------	---------------	-------------------------------------

1	9	0,840	0,832	0,838	0,741	8,071
1	9	0,832	0,832	0,882	0,733	7,984
Concentración promedio						8,028

De los resultados previamente presentados se evidencia que la metodología 1, permite estimar mayor contenido de compuestos fenólicos en comparación con las metodologías 2, 3 y 4 previamente mencionadas, por esta razón se seleccionó la metodología 1 para definir el contenido de polifenoles presentes en las formulaciones de chocolate enriquecido con cápsulas. Es importante destacar que la metodología seleccionada no permite cuantificar en su totalidad los compuestos polifenólicos presentes en las formulaciones, por este motivo se determinó la tasa de compuestos fenólicos recuperados.

Apéndice D. Análisis estadísticos

Para determinar las diferencias significativas de los resultados obtenidos en la digestión *in vitro* de bioaccesibilidad, liberación de polifenoles y capacidad antioxidante en cada fase de digestión se realizaron pruebas ANOVA en el software STATGRAPHICS.

Digestión *in vitro*

Liberación de compuestos polifenólicos chocolates enriquecidos

Figura D1

ANOVA liberación de compuestos en fase intestinal de chocolates enriquecidos con extractos encapsulados y sin encapsular

Análisis de Varianza para Fase Intestinal Liberación - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	0,415516	2	0,207758	0,69	0,5525
B:BLOQUE	11,8821	2	5,94107	19,75	0,0085
RESIDUOS	1,20325	4	0,300813		
TOTAL (CORREGIDO)	13,5009	8			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Bioaccesibilidad chocolates enriquecidos

Figura D2

ANOVA bioaccesibilidad en fase intestinal de chocolates enriquecidos con extractos encapsulados y sin encapsular

Análisis de Varianza para Bioaccesibilidad - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	118,703	2	59,3517	22,97	0,0064
B:BLOQUE	114,431	2	57,2157	22,14	0,0069
RESIDUOS	10,3351	4	2,58378		
TOTAL (CORREGIDO)	243,47	8			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Capacidad antioxidante

Figura D3

ANOVA capacidad antioxidante en fase intestinal de chocolates enriquecidos con extractos encapsulados y sin encapsular

Análisis de Varianza para Capacidad antioxidante - Suma de Cuadrados Tipo III					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	4438,39	2	2219,19	0,22	0,8143
B:BLOQUE	99520,6	2	49760,3	4,85	0,0852
RESIDUOS	41024,3	4	10256,1		
TOTAL (CORREGIDO)	144983,	8			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Apéndice E. Llenado de microplaca ámbar para análisis ORAC

Para la medición de la capacidad antioxidante de los polifenoles de las diferentes muestras sin digerir y las muestras obtenidas de la digestión *in vitro* y controles de los polifenoles y

chocolate, se utilizó el ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), siguiendo la metodología propuesta por Huang et al. (Pico-Hernández et al., 2020). En resumen, se usó una microplaca ámbar de noventa y seis pozos con 150 μ L de la solución de fluoresceína de trabajo diario y 25 μ L de la muestra de polifenoles a una concentración conocida en las columnas (1-5) y 25 μ L de trolox a concentraciones conocidas e iguales a las concentraciones de las muestras en las columnas (6-10) y las columnas (11-12) fueron el blanco y el control respectivamente. La placa se incubó a 37 °C durante 10 min en un espectrofluorímetro (Thermo Scientific Fluoroskan Ascent), la reacción dio inicio mediante la adición de 25 μ L de solución AAPH. El descenso de la fluoresceína fue monitoreado cinéticamente, cada minuto durante 1 h, utilizando longitudes de onda de emisión y excitación de 485 y 528 nm, respectivamente.

Figura E1

Llenado de placa ámbar para análisis ORAC

