



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DIGESTIBILIDAD DE GRASAS Y LIBERACIÓN DE POLIFENOLES EN DIFERENTES TIPOS DE CHOCOLATE

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNO/A: Vanesa Yomaly Zegada Franco

TUTOR/A ACADÉMICO: Ana Belén Heredia Gutiérrez

COTUTOR/A: Ana María Andrés Grau

DIRECTOR EXPERIMENTAL: Irene Peinado Prado

Curso Académico: 2017/2018

VALENCIA, 5 DE FEBRERO DE 2018

DIGESTIBILIDAD DE GRASAS Y LIBERACIÓN DE POLIFENOLES EN DIFERENTES TIPOS DE CHOCOLATE

Zegada, V., Heredia, A.¹ y Andrés A.¹, Peinado, I.¹

RESUMEN

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es una afección que da lugar a una producción insuficiente de enzimas digestivas, para procesar los macronutrientes de los alimentos en la etapa duodenal de la digestión. Su tratamiento consiste en la ingesta de suplementos enzimáticos, cuya dosificación, actualmente, está dada por la edad y peso del individuo, así como la cantidad de grasa a consumir. No obstante, existen factores propios de cada alimento, como su estructura matricial y perfil lipídico, y particulares a cada individuo, como su pH intestinal y concentración biliar, que también pueden influir en la dosis requerida.

El presente estudio aplica un modelo estático de digestión gastrointestinal *in vitro* para evaluar la eficacia de diferentes dosis del suplemento enzimático Kreon© (de 0 a 4000 UL/g de grasa), bajo distintas condiciones fisiológicas (pH intestinal 6 y 7, concentración biliar 1 y 10 mM), sobre la extensión de la lipólisis y la liberación de polifenoles, en cinco tipos de chocolate en barra (con leche, negro, blanco, confeti y con almendras) y un chocolate untable.

Se ha determinado la relevancia de la presencia enzimática (Kreon©) sobre la extensión de la lipólisis de este tipo de alimento, alcanzando valores máximos correspondientes a dosis óptimas de enzimas, a partir de los cuales, un incremento adicional en la dosis resulta desfavorable. Así mismo, se ha detectado una liberación de polifenoles durante las etapas gástrica e intestinal, siendo importante para este efecto la presencia enzimática (Kreon©) en esta última etapa.

PALABRAS-CLAVE: insuficiencia pancreática exocrina; digestibilidad; chocolate; lípidos; polifenoles.

ABSTRACT

Pancreatic Exocrine Insufficiency (PEI) is a condition, in the duodenal stage of digestion, that gives place to an insufficient production of digestive enzymes to process food macro-nutrients. Its treatment consists on the ingestion of enzymatic supplements, which dosage, nowadays, is given by the age and weight of the individual, as well as the amount of fat to be consumed. Nevertheless, there are specific factors of each food, as its matrix structure and lipidic profile, and particular to each individual as its intestinal pH and bile concentration, that may also influence the required dose.

¹ Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IU-IAD). Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia.

The present study applies an *in vitro* static gastrointestinal digestive model to evaluate the efficiency of different doses of the enzymatic supplement Kreon© (from 0 to 4000 LU/g of fat), under various physiological conditions (intestinal pH 6 and 7, bile concentration 1 and 10 mM), on the lipolysis extension and the liberation of polyphenols, in five types of chocolate tablets (with milk, black, white, confetti, and with almond) and one spreadable chocolate.

The relevance of the enzymatic presence (Kreon©) lipolysis extension of this type of food, achieving maximum values corresponding to optimal enzyme doses, from which an increase in dose results unfavourable. Likewise, a liberation of polyphenols during the gastric and intestinal stages was detected, being the enzymatic presence (Kreon©) on the last stage important for this effect.

KEY-WORDS: Exocrine pancreatic insufficiency; digestibility; chocolate; lipids; polyphenols.

RESUM

La insuficiència pancreàtica exocrina (IPE) és una afecció que dona lloc a una producció insuficient de enzims digestius per a processar els macronutrients dels aliments en l'etapa duodenal de la digestió. El seu tractament consisteix en la ingesta de suplementos enzimàtics, la dosificació de la qual, actualment, està donada per l'edat i pes de l'individu, així com la quantitat de greix a consumir. No obstant això, hi ha factors propis de cada aliment, com la seua estructura matricial i el seu perfil lipídic

, i particulars de cada individu, com el pH intestinal i concentració biliar, que també poden influir en la dosi requerida.

El present estudi aplica un model estàtic de digestió gastrointestinal *in vitro*, per a avaluar l'eficàcia de diferents dosis del suplement enzimàtic Kreon© (de 0 a 4000 UL/g de greix), davant distintes condicions fisiològiques (pH intestinal 6 i 7; concentració biliar 1 i 10 mM), sobre l'extensió de la lipólisis i l'alliberament de polifenols, en cinc tipus de xocolata (amb llet, negre, blanc, confetti i amb ametles) i un xocolata untable.

S'ha determinat la rellevància de la presència enzimàtica (Kreon©) sobre l'extensió de la lipólisis d'aquest aliment, aconseguint valors màxims corresponent a dosis òptimes d'enzims, a partir dels quals un increment addicional en la dosi, resulta desfavorable. Així mateix, s'ha detectat un alliberament de polifenols durant les etapes gàstrica i intestinal, sent important per a este efecte la presència enzimàtica (Kreon©) en esta última etapa.

PARAULES-CLAU: Insuficiència pancreàtica exocrina; digestibilitat; xocolata; lipids; polifenols.

1. INTRODUCCIÓN

La insuficiencia pancreática exocrina (IPE) es una afección que da lugar a una producción insuficiente de enzimas digestivas, por parte del páncreas, para procesar los nutrientes de los alimentos en la etapa duodenal, generando malnutrición y problemas asociados. Esta dolencia da lugar a síntomas como dolor abdominal, gas e hinchazón, diarrea, estratorrea, heces con olor fétido, sensación de saciedad y pérdida de peso injustificada, entre otros, siendo las causas principales de la IPE la pancreatitis aguda, la fibrosis quística y el cáncer de páncreas, aunque también puede ser consecuencia de cirugías en el estómago, páncreas o intestino delgado (Canadian Digestive Health Foundation, 2018).

El tratamiento de la IPE consiste en la administración oral de suplementos enzimáticos gastro-resistentes, junto con las comidas (Domínguez-Muñoz, 2011). Dichos suplementos contienen pancreatina, una combinación de las enzimas digestivas lipasa, proteasa y amilasa. Su dosificación actualmente se basa en la severidad de la afección, además de la edad y peso de cada individuo, así como la cantidad de grasa a consumir (U.S. Food and Drug Administration, 2009). No obstante, existen factores propios del alimento, como su perfil lipídico y estructura matricial, así como características particulares del individuo, como su pH intestinal y la concentración biliar de su entorno duodenal, que podrían afectar de manera importante la actividad del suplemento, y por tanto a la digestibilidad de nutrientes, siendo necesaria una dosis distinta a la actualmente suministrada, que no toma en consideración estos últimos factores.

Puesto que los lípidos se hidrolizan principalmente en el duodeno por acción de las lipasas (Griffiths, 2014), la digestión de los mismos se encuentra más comprometida en relación a los otros macronutrientes. Por otra parte, no se sabe con exactitud si la insuficiencia pancreática puede afectar de manera indirecta la absorción de otros compuestos como vitaminas liposolubles y antioxidantes.

En este marco, se encuentra en desarrollo un proyecto a nivel europeo, mediante el cual se pretende generar una base de datos con el fin de que las personas con insuficiencia pancreática puedan consultar, de manera personalizada, la dosis de suplemento que deben consumir en función al alimento a ingerir (European Commission, 2018). Para esto, se realizó una pesquisa sobre los alimentos de mayor interés para la población infantil europea, siendo que actualmente los niños son la prioridad en cuanto al tratamiento de esta dolencia.

El análisis de la influencia de los factores mencionados es posible aplicando modelos de digestión *in vitro*, que permiten una mayor reproducibilidad de las pruebas frente a los ensayos *in vivo*, al tenerse un mayor control sobre las variables involucradas. Por otra parte, considerando la elevada cantidad de análisis necesarios, los métodos *in vitro*, hacen posible la obtención de resultados a la rapidez requerida y con un significativo ahorro de costes frente a los *in vivo*, siendo que estos últimos se aplican al momento de validar los resultados logrados mediante los primeros.

En el presente estudio, el alimento analizado es el chocolate, una emulsión alimentaria compleja, en estado sólido semi-plástico. El ingrediente característico de este alimento es la pasta de cacao (semillas de cacao deshidratadas, tostadas y molidas). Otros ingredientes en su composición, según el tipo de chocolate, son azúcares, lácteos y proteínas de leche, emulsificantes, antioxidantes, frutos secos, cereales, sal y saborizantes artificiales o naturales (U.S. Food and Drug Administration, 2018). El contenido graso de este alimento es elevado, superando generalmente los 30g de grasa por 100g de alimento (United States Department of Agriculture, 2018). La manteca de cacao, que genera el principal aporte graso del chocolate, tiene un perfil lipídico en el que priman el ácido oleico ($\approx 35\%$ p/p), esteárico ($\approx 34\%$ p/p) y palmítico ($\approx 27\%$ p/p), con fracciones menores de ácido linoléico, araquídico, palmitoléico, margárico, α -linoléico y mirístico (Álvarez, Murilo, Murillo, Rojano, & Méndez, 2016). Por otra parte, es un alimento rico en polifenoles, siendo una de las mayores fuentes alimentarias conocidas de flavan-3-oles o flavanoles (Liwei, y otros, 2004), habiéndose demostrado, mediante estudios en humanos, que dichos polifenoles pueden mejorar el metabolismo de la glucosa y reducir riesgos cardiovasculares (Almoosawi, Tsang, Ostertag, Fyfed, & Al-Dujailid, 2012).

Bajo estas consideraciones, el presente estudio tiene como principal objetivo la aplicación de un modelo estático de digestión gastrointestinal *in vitro*, para evaluar la eficacia de diferentes dosis del suplemento enzimático Kreon©, además de la influencia de distintas condiciones de pH y concentración biliar en la etapa intestinal, a una dosis de Kreon© fija, sobre la digestión de lípidos y bio-accesibilidad de polifenoles totales de diferentes tipos de chocolate en barra (con leche, negro, blanco, con confeti y con almendras) y un chocolate untable.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales y Reactivos

Para la preparación de los fluidos digestivos simulados se utilizaron los siguientes reactivos (*Sigma-Aldrich*): KCl, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , NaCl, $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$, $(\text{NH}_4)\text{CO}_3$, y CaCl_2 (0,3 M); además de bilis bovina (B3883, *Sigma-Aldrich*) y enzimas digestivas: α -amilasa extraída de saliva humana (A0521, *Sigma-Aldrich*), pepsina procedente de mucosa gástrica porcina (P6887, *Sigma-Aldrich*) y pancreatina porcina comercial en cápsulas en forma de microesferas gastro-resistentes (*Kreon© Abbott*), siendo cada cápsula equivalente a 10.000 U. lipasa, 8.000 U. amilasa, y 600 U proteasa. Para ajustar el pH de los fluidos, en las diferentes etapas de la digestión, se utilizó HCl 1N (etapa gástrica) (*AppilChemPanreac*) y NaOH 1N (etapa intestinal) (*AppilChemPanreac*). Para el desarrollo del análisis de ácidos grasos libres o extensión de la lipólisis se utilizó Tritón X-100 (*Sigma-Aldrich*), etanol (*Labkem*) y kits enzimáticos para el análisis de AG libres (*Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA*). El contenido de polifenoles totales se determinó haciendo uso de metanol (*Sigma-Aldrich*), reactivo Folin Ciocalteu (*Sigma-Aldrich*) y Na_2CO_3 (*Sigma-Aldrich*).

Las muestras analizadas corresponden a la marca Día, a excepción del chocolate untable, de la marca Nutella. Los ingredientes y composición de las mismas se presenta en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Ingredientes y composición de los diferentes chocolates sometidos a una digestión *in vitro* gastrointestinal

Muestra	Ingredientes	% mín. de cacao	% azúcar	% grasa	% proteína
Chocolate untable	Azúcar, manteca de palma, avellanas (13%), cacao desgrasado (7,4 %), leche desnatada en polvo (6,6 %), suero lácteo en polvo, emulgentes: lecitinas (soja), vainillina.	7,4	56,8	31,6	6,0
Chocolate con leche	Azúcar, leche entera en polvo, manteca de cacao, pasta de cacao, lactosuero en polvo, emulgente (lecitinas (contiene soja) y aroma.	30	55,0	31,0	7,0
Chocolate negro	Pasta de cacao, azúcar, manteca de cacao, cacao desgrasado en polvo, emulgente (lecitinas), aroma natural de vainilla.	74	27,0	40,0	10,4
Chocolate blanco	Azúcar, manteca de cacao, leche entera en polvo, lactosuero en polvo, lactosa, emulgentes (lecitinas (contiene soja), E476 (polirricinoleato de poliglicerol)) y aroma.	n.e.	59,0	31,0	6,0
Chocolate confeti	Chocolate con leche: Azúcar, manteca de cacao, leche entera en polvo, pasta de cacao, lactosa, mantequilla, emulgentes (lecitina de soja y E-476 (polirricinoleato de poliglicerol)) y aromas. Grageas de chocolate con leche recubiertas de azúcar coloreado (Lacasitos) (18%): Azúcar, manteca de cacao, pasta de cacao, leche entera en polvo, leche desnatada en polvo, colorantes (concentrado de frutas y verduras (rábano, grosella negra, limón), concentrado de espirulina), emulgente (lecitina de soja), almidón de arroz, agentes de recubrimiento (E-414, E-903, E-901) y aroma.	32 (tableta)	57,0	32,0	5,6
		37 (gragea)			
		Prom. pond. 33			
Chocolate con almendra	Azúcar, leche entera en polvo, almendras tostadas partidas (15%), manteca de cacao, pasta de cacao, lactosuero en polvo, emulgente (lecitinas (contiene soja) y aroma.	30	47,0	35,0	10,0

2.2 Preparación de la muestra

Para llevar a cabo la digestión, las muestras se desestructuraron mecánicamente con ayuda de un mortero y se tomó, como cantidad a digerir, una masa de producto correspondiente a 0,35 g de grasa.

2.3 Modelo estático de digestión *in vitro*

La simulación de la digestión gastrointestinal se realizó mediante un modelo estático en tres etapas: oral, gástrica y duodenal. En base al protocolo consensuado a nivel europeo por la *ACTIONCOST INFOGEST* (Minekus, y otros, 2014). Las condiciones de la etapa duodenal fueron ampliadas respecto al método mencionado, con el fin de analizar la influencia de la concentración

enzimática, pH y concentración de sales biliares, sobre la digestibilidad de lípidos y liberación de polifenoles de los alimentos analizados.

Para llevar a cabo la digestión *in vitro* se prepararon los fluidos salival (SSS), gástrico (SGF) e intestinal (SIF), haciendo uso de las correspondientes enzimas digestivas, electrolitos y bilis. La composición de estos tres fluidos digestivos se describe en la Tabla 2.2, que a su vez se elaboraron haciendo uso de las correspondientes disoluciones stock, cuyos constituyentes y concentración de electrolitos recomendada se presentan en la Tabla 2.3 y Tabla 2.4, respectivamente.

Tabla 2.2. Composición del Fluido Salival Simulado (SSS), Fluido Gástrico Simulado (SGF) y Fluido Intestinal Simulado (SIF)

Constituyente	SSS pH 7	SGF pH 3	SIF pH 6 o 7
SSS (mL)	400	---	---
SGS(mL)	---	375	---
SIS(mL)	---	---	452,08
α -amylasa (mg)	12	---	---
CaCl ₂ (mL)	1,25	0,25	0,83
Pepsina (mg)	---	41,86	---
Bilis(mg)*	---	---	439,83
Volumen final(mL)**	500	500	500

* La masa de bilis corresponde a 1 mM.

** Se enrasó el volumen a 500mL en todos los casos una vez ajustado el pH correspondiente a cada fluido

Tabla 2.3. Composición recomendada para la preparación de un litro de las disoluciones de Stock Salivar Simulado (SSS), Stock Gástrico Simulado (SGS) y Stock Intestinal Simulado (SIS)

Constituyente	SSS(mL)	SGS(mL)	SIS(mL)
KCl	30,2	13,8	13,6
KH ₂ PO ₄	7,4	1,8	1,6
NaCl	6,8	23,6	18,3
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	1,0	0,8	2,2
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,12	1	---
NaHCO ₃	---	25	95
H ₂ O	954,48	934	869,3

Tabla 2.4 Concentraciones de electrolitos recomendadas para la preparación de un litro del Stock Salivar Simulado (SSS), Stock Gástrico Simulado (SGS) y Stock Intestinal Simulado (SIS)

Constituyente	SSS(mL)	SGS(mL)	SIS(mL)
K ⁺	18,8	7,8	7,6
Na ⁺	13,6	72,2	123,4
Cl ⁻	19,5	70,2	55,5
H ₂ PO ₄ ⁻	3,7	0,9	0,8
HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	13,7	25,5	85
Mg ²⁺	0,15	0,1	0,33
NH ₄ ⁺	0,12	1	---
Ca ²⁺	1,5	0,15	0,6

Para cada digestión, la masa de chocolate correspondiente a 0,35 g de grasa se introdujo en un tubo Falcon® de 50 mL, al cual se añadieron 5 mL de SSS. Seguidamente, para simular la etapa gástrica, se añadieron 10 mL de SGF, se ajustó el pH a 3, haciendo uso del pH-metro (*SevenCompact™ S210, Mettler Toledo*) y se mantuvo el tubo en la cámara de incubación (*SELECTA modelo Boxcult 3000957*) a una temperatura constante de 37 °C, con una agitación circular (arriba-abajo) de 55 rpm durante 2 horas, en el rotador (*Intelli – Mixer RM-2*). Al finalizar la etapa gástrica, se simuló la etapa intestinal con la adición de 20 mL de SIF al tubo, aplicando las combinaciones de concentración de Kreon© (mg/mL) y concentración de sales biliares (mM) detalladas en el diseño experimental presentado en la Tabla 2.5. La equivalencia de la actividad lipasa, según las dosis de Kreon© suministrada, se presenta en la Tabla 2.6. El pH se ajustó al nivel correspondiente al ensayo (6 ó 7) y se colocó el tubo nuevamente en la cámara, durante 2 horas adicionales, bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación de la etapa gástrica. Finalizada la digestión, las muestras se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y, a continuación, el pH se ajustó a 9, con el fin de inactivar la acción enzimática.

Tabla 2.5. Diseño Experimental aplicado para llevar a cabo los ensayos de digestión *in vitro* de los diferentes tipos de chocolates

Nomenclatura	Kreon© (mg/mL)	UL (UL/g grasa)	pH	Molaridad biliar (mM)
0	0	0	6	1
1000	0,24	1000	6	1
2000	0,48	2000	6	1
3000	0,71	3000	6	1
4000	0,95	4000	6	1
6/10	0,48	2000	6	10
7/1	0,48	2000	7	1
7/10	0,48	2000	7	10

Tabla 2.6. Equivalencia de la actividad lipasa en función a la dosis de Kreon©

Kreon© (mg/mL)	Actividad lipasa	
	UL / g grasa	UL / mL
0,24	1000	9,32
0,48	2000	18,64
0,71	3000	27,97
0,95	4000	37,29

Las digestiones *in vitro* para cada muestra y condición descrita en la Tabla 2.5, se llevaron a cabo por triplicado, siendo que las determinaciones analíticas se desarrollaron al final de la etapa intestinal, salvo en el caso del análisis de polifenoles que se realizó después de cada etapa simulada (oral, gástrica e intestinal).

2.4 Determinaciones analíticas

DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ

La degradación de la matriz representa la cantidad de sólidos dispersados durante la digestión. Finalizada la digestión, con el pH ajustado a 9, las muestras se centrifugaron en tubos Falcon® en la centrífuga (*Eppendorf, Centrifuge 5804 R*), a 4000 rpm durante 20 minutos y se filtraron en un tamiz de 1 mm de luz, separando la fase micelar (FM) de la fase sólida (FS). La FS se introdujo en recipientes de aluminio (previamente pesados) y se mantuvieron en la estufa de vacío (a 63 °C), durante 48 horas (hasta peso constante). El índice de degradación de la matriz (IDM) se calculó mediante la Ecuación 1 (Lamothe, Corbeil, Turgeon, & Britten, 2012).

$$IDM(\%) = \frac{CS_0 - CS_t}{CS_0} * 100 \quad (1)$$

Donde CS_0 es el contenido de sólidos del alimento antes de la digestión y CS_t es el contenido de sólidos no dispersados al final de la misma.

ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS LIBRES

Para solubilizar los ácidos grasos libres y asegurar que no se reiniciara la actividad lipasa, 100 µL de la FM de cada muestra se diluyeron en 10 mL de una disolución acuosa (5,6% de Tritón X-100 y 6% de etanol).

La extensión de la lipólisis se estimó espectrofotométricamente a 564 nm, empleando previamente un kit enzimático (*Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA*) sobre la disolución descrita (Lamothe, Corbeil, Turgeon, & Britten, 2012). Los valores de absorbancia de las muestras se compararon con una recta de calibrado obtenida empleando ácido palmítico (1 µmol de ácido palmítico / mL = 0,23 x abs). La extensión de la lipólisis se expresó como porcentaje de ácidos grasos libres tras la digestión, respecto a la muestra inicial, teniendo en cuenta que, por cada molécula de triglicéridos, se liberan dos ácidos grasos.

ANÁLISIS DE CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES

La determinación de polifenoles totales se realizó espectrofotométricamente por medio del método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999) con algunas modificaciones en la extracción inicial, ajustadas para el tipo de alimento analizado.

Primeramente, se procedió a la extracción de los polifenoles totales en las muestras de chocolate digeridas (50mg) con 1 mL de disolución metanol-agua 80:20 (v:v), mediante agitación a 55°, durante 120 min. A continuación, la mezcla se centrifugó a 14,5 rpm, durante 20 minutos, haciendo uso de la centrífuga (Eppendorf® Minispin®).

Tras la extracción, se adicionaron 0,5 mL de agua bidestilada y 125 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu, a 125 μ L del extracto metanólico y la mezcla se dejó en reposo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 1,25 mL de Na_2CO_3 (7% w/v) y 1 mL de agua bidestilada y se dejó la muestra en reposo durante 30 min adicionales. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia de la muestra a 760 nm en el espectrofotómetro.

El contenido de polifenoles totales se cuantificó por medio de una curva patrón de ácido gálico (abs = 0,0009 μ mol de ácido gálico / L) y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (AG) equivalente por gramo de alimento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza multifactoriales (ANOVA multifactorial), mediante el programa Statgraphics Centurion, con un nivel de confianza del 95% (valor-P \leq 0,05).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Degradación de la matriz (IDM): Influencia de las condiciones de simulación de la fase intestinal

Durante la digestión, además de la composición del alimento, la estructura de la matriz del mismo define su índice de degradación. En el caso del chocolate, la humedad y el contenido de azúcares, así como de la pasta y manteca de cacao son determinantes para la cinética y la estructura de la matriz del mismo.

Se analizó el efecto del pH intestinal (6 y 7) y la concentración biliar (1 y 10 mM) sobre el IDM a una dosis de Kreon© (0,48 mg/mL) constante, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 3.1. Ninguna de estas variables influyó significativamente sobre valor del IDM (Tabla 3.1) (95% de confianza). Aunque la temperatura de fusión del chocolate depende de varios factores, aquel de mayor influencia es la forma polimórfica en la cual cristaliza la manteca de cacao, estas formas pueden ser 6 diferentes, teniendo la más estable una temperatura de fusión de 36 °C (Afoakwa, Paterson, & Fowler, 2007). Este hecho hace que el chocolate pase a estado líquido rápidamente dentro de la boca (\approx 37 °C), facilitando su solubilización, hecho que explica los elevados valores de IDM obtenidos. Por otra parte, entre los componentes mayoritarios del chocolate, aquél con mayor solubilidad es el azúcar (sacarosa). Por tanto, se espera que se facilite la degradación de aquellos chocolates con mayor contenido de este ingrediente. Ese hecho puede verse reflejado en los resultados, donde el chocolate negro, cuyo componente principal es la pasta de cacao (cacao \geq 74%), tiene un menor IDM, en relación a las otras muestras (cacao \leq 33%) que tienen azúcar como componente principal (ver Tabla 2.1).

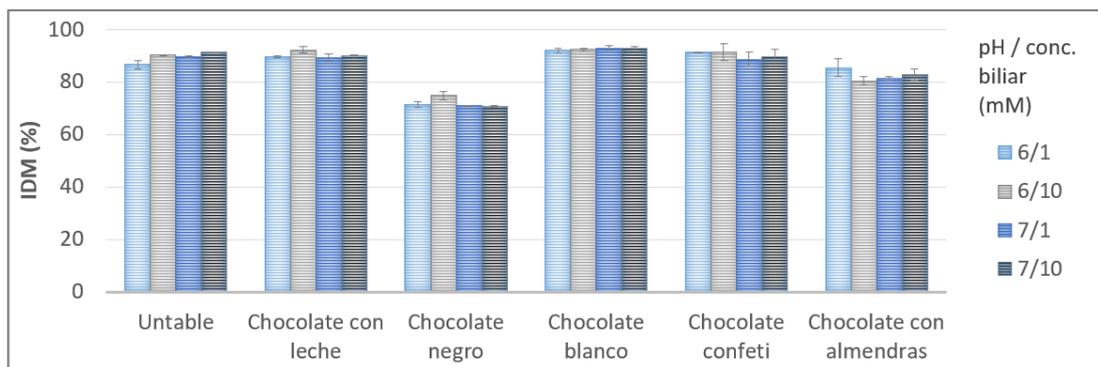


Figura 3.1. IDM (%) en función a la muestra, pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM), bajo una dosis de Kreon® (0,48 mg/mL) constante

Tabla 3.1. ANOVA multifactorial para el IDM(%) en función a la muestra, pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM), bajo una dosis de Kreon® (0,48 mg/mL) constante

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Muestra	2400,72	5	480,144	199,25	0,0000
B:pH	4,55101	1	4,55101	1,89	0,1821
C:Billis	6,99213	1	6,99213	2,90	0,1014

Los resultados de los valores del IDM de las muestras, para distintas dosis de Kreon®, a pH (6) y concentración biliar (1 mM) constantes se muestran en la Figura 3.2. Se confirma un menor índice de degradación del chocolate negro en relación a las otras muestras. Así mismo, se determinó un índice degradación levemente menor en ausencia de Kreon®, no teniéndose diferencias significativas en el IDM para las distintas dosis de suplemento.

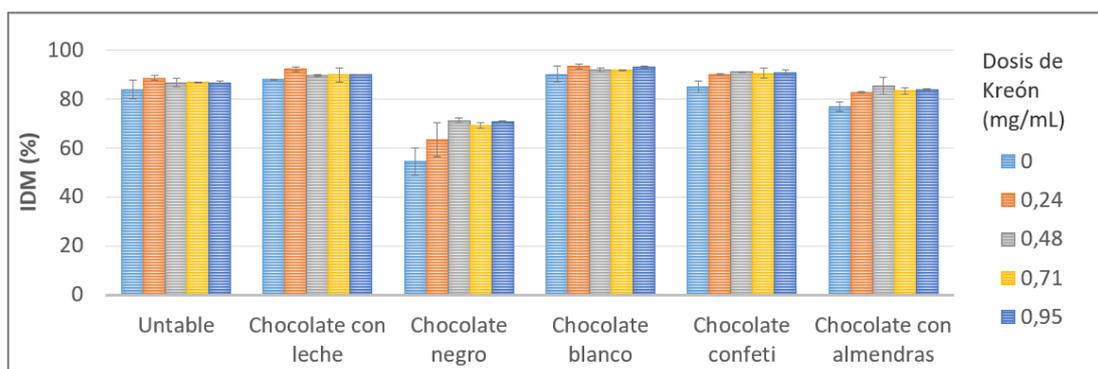


Figura 3.2. IDM (%) en función a la muestra y dosis de Kreon® (mg/mL), a pH intestinal (6) y concentración biliar (1 mM) constantes

En base a estos resultados, se realizó un análisis de regresión múltiple (Tabla 3.2) para evaluar si el contenido de macronutrientes influye sobre el valor del IDM, en presencia de Kreon®, encontrándose que, tanto el contenido de carbohidratos (sacarosa), como de grasa son determinantes en la degradación de la matriz del alimento, no siéndolo, en este caso, el contenido de proteína, (95% de confianza). No se incluyó al chocolate untable en dicho análisis al tener una matriz moderadamente distinta a la del chocolate, además de tener un perfil lipídico diferente al de los chocolates, siendo que la manteca de palma aporta el mayor porcentaje graso de este alimento.

Tabla 3.2. Análisis de regresión múltiple para la evaluación de la relación entre el contenido de macronutrientes (azúcar, grasa y proteína) y el promedio del IDM (%) de los diferentes tipos de chocolate analizados (con leche, negro, blanco, confeti y con almendras), con dosis de Kreon® entre 0,24 mg/mL y 0,95 mg/mL

Parámetro	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
%Azúcar (g/100g muestra)	675,192	1	675,192	2017,44	0,0000
%Grasa (g/100g muestra)	4,14229	1	4,14229	12,38	0,0125
%Proteína (g/100g muestra)	0,321469	1	0,321469	0,96	0,3649

Teniendo en cuenta solamente los macronutrientes significativamente influyentes (azúcar y grasa) sobre el IDM y dado que no existen diferencias relevantes entre las matrices de las muestras incluidas en el análisis, se aplicó la regresión múltiple para definir una ecuación de predicción del IDM del chocolate en función a su contenido de azúcar y grasas (ecuación 2), habiéndose obtenido una correlación fuerte entre las variables.

$$IDM \text{ chocolate } (\%) = 102.024 + 0,393273 * \%Azúcar - 1,06753 * \%Grasa \quad (2)$$

$$(r^2 = 0,9966)$$

3.2 Extensión de la lipólisis: Influencia de las condiciones de simulación de la fase intestinal

La mayor parte de la grasa de los alimentos se encuentra en forma de triglicéridos (TTG), un complejo compuesto por una unidad de glicerol y tres unidades de ácidos grasos (AG), contribuyendo estos con un 90-95% de la energía derivada de grasas (Iqbal & Hussain, 2009).

Durante el proceso de lipólisis, los lípidos complejos son hidrolizados liberando ácidos grasos mediante la acción catalítica de enzimas (Griffiths, 2014), para ser absorbidos en el intestino delgado y convertidos posteriormente en energía.

Al ser sustancias hidrofóbicas, para ser adecuadamente digeridos, los lípidos deben ser solubilizados por las sales biliares, adquiriendo la forma de pequeñas gotas o micelas (Griffiths, 2014). Este hecho incrementa la superficie de reacción, favoreciendo la lipólisis, siendo que la lipasa pancreática actúa sobre los triglicéridos en la interfase del glóbulo graso, existiendo una acción sinérgica entre la lipasa, la co-lipasa y la bilis (Scattering, 2000).

Por otra parte, las secreciones pancreáticas neutralizan el pH del alimento que llega de la etapa gástrica, brindando las condiciones alcalinas necesarias para la actividad hidrolítica de las enzimas que actúan en el intestino delgado. El bolo alimenticio inicia su tránsito en el intestino delgado con un pH aproximado 6,3, alcanzando un pH entre aproximadamente 7,3 a la salida del mismo, en individuos adultos sanos (Fallingborg, y otros, 1990), siendo que el pH se encuentra en un rango fisiológico entre 6,75 y 6,85 durante la hidrólisis de los TG (Benito-Gallo, y otros, 2015).

Los resultados para la extensión de la lipólisis (Figura 3.3), a distintas concentraciones biliares (1 y 10 mM) y pH intestinal (6 y 7), a una dosis de Kreon© fija (0,48 mg/mL), revelan diferencias entre muestras, como confirma el ANOVA multifactorial aplicado (Tabla 3.3), notándose una influencia positiva de una concentración alta de bilis, a pH 7 confirmándose que la emulsificación de la grasa es esencial para promover la acción de las lipasas. Al contrario, el pH intestinal no presentó una influencia significativa, hecho que podría representar una efectiva acción de las lipasas dentro de los rangos de pH estudiados.

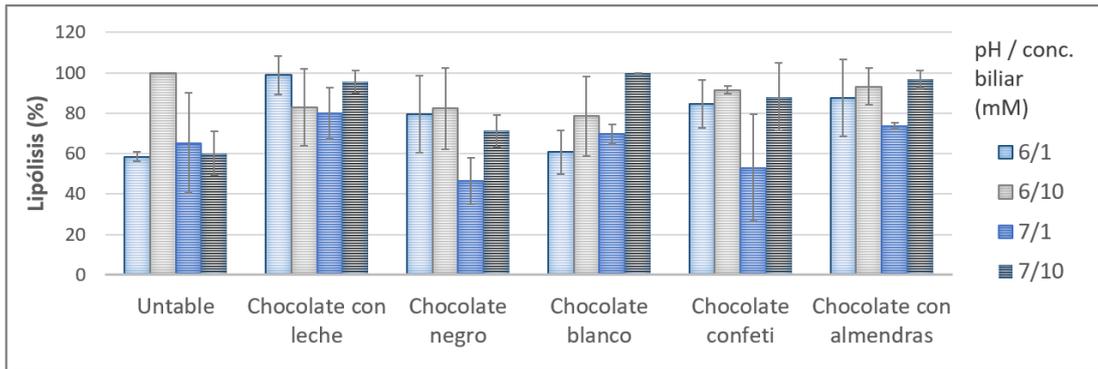


Figura 3.3. Extensión de la lipólisis (%) en función a la muestra, pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM), bajo una dosis de Kreon© (0,48 mg/mL) constante

Tabla 3.3. ANOVA multifactorial para la extensión de la lipólisis (%) en función a la muestra, pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM), bajo una dosis de Kreon© constante (0,48 mg/mL)

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Muestra	2697,75	5	539,55	3,14	0,0255
B:pH	328,653	1	328,653	1,91	0,1794
C:Bilis	3974,88	1	3974,88	23,13	0,0001

Los resultados de la extensión de la lipólisis a diferentes concentraciones de Kreon© (mg/mL), a pH 6 y concentración biliar 1 mM (Figura 3.4) una importante influencia de la dosis de Kreon©, bajo una misma tendencia, hecho confirmado mediante un ANOVA multifactorial (Tabla 3.4) (95% de confianza).

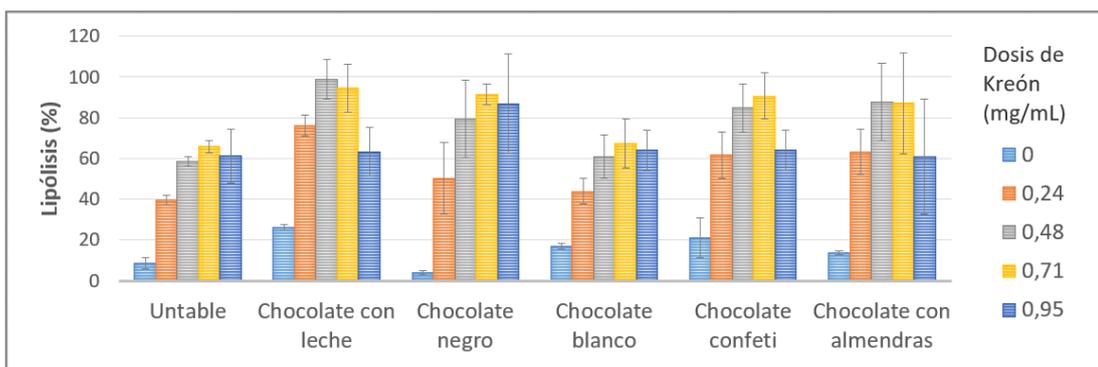


Figura 3.4. Extensión de la lipólisis (%), en función a la dosis de Kreon© (mg/mL), a pH intestinal (6) y concentración biliar (1 mM) constantes

Tabla 3.4. ANOVA multifactorial para la extensión de la lipólisis (%), en función a la muestra y la dosis de Kreon© (mg/mL), a pH intestinal (6) y concentración biliar (1 mM) constantes

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Muestra	4721,82	5	944,364	5,93	0,0006
B:Dosis de Kreon© (mg/mL)	35770,6	4	8942,65	56,15	0,0000

En todos los casos, la tendencia observada al aumentar la dosis de Kreon© es similar, esto es, un incremento de la dosis de enzima que se traduce inicialmente en un aumento de la extensión de la lipólisis hasta alcanzar un valor máximo a partir del cual la lipólisis disminuye al elevarse la dosis. Para modelizar esta tendencia se aplicó un modelo polinomial de segundo grado (ecuación 3) con el que se obtuvieron valores de $r^2 > 0,95$. Mediante las constantes obtenidas para las ecuaciones, se calculó la lipólisis máxima (%) para cada muestra, y su correspondiente dosis óptima de Kreon© (mg/mL) (Tabla 3.5).

$$\%Lipólisis = a * Dosis_{Kreon}^2 + b * Dosis_{Kreon} + c \quad (3)$$

Tabla 3.5. Constantes del modelo de determinación del porcentaje de lipólisis (%), en función a la dosis de Kreon© (mg/mL); valores de lipólisis máxima (%) y dosis óptima de Kreon© (mg/mL), para cada tipo de chocolate

	Valores ecuación modelo			Lipólisis máxima (%)	Dosis Kreon© óptima (mg/mL)
	a	b	c		
Chocolate unttable	-103,523	153,615	8,68364	66	0,74
Chocolate con leche	-238,526	265,689	26,2598	100	0,56
Chocolate negro	-148,967	229,111	3,80287	92	0,77
Chocolate blanco	-88,8891	134,128	16,9091	68	0,75
Chocolate confeti	-152,789	206,293	21,0163	91	0,68
Chocolate con almendra	-222,629	261,631	13,4122	90	0,59

3.3 Liberación de polifenoles totales: Liberación en cada fase digestiva e influencia de las condiciones de simulación de la fase intestinal

La fracción soluble de los compuestos bioactivos está directamente relacionada con la bio-accesibilidad del compuesto en cuestión y es resultado de los fenómenos de liberación de la matriz que puede tener lugar durante las diferentes etapas del proceso digestivo.

Se determinó la cantidad de polifenoles inicial de cada muestra y la fracción solubilizada (mg equivalente de ácido gálico/ g de producto) al final de cada etapa simulada: oral, gástrica e intestinal; y para esta última se analizó la influencia de las condiciones intestinales sobre la liberación de estos compuestos. En los alimentos, los polifenoles pueden encontrarse en forma de ésteres, glucósidos o polímeros que, para poder ser absorbidos, deben hidrolizarse por enzimas digestivas o la microflora colónica (Manach, Augustin, Morand, Rémésy, & Jiménez, 2004), pudiendo existir una liberación de polifenoles durante las etapas digestivas.

La cantidad inicial de polifenoles obtenida (Figura 3.5) fue relativa al contenido de cacao de las muestras, a excepción del chocolate untable, cuyo valor puede ser resultado de la sumatoria de los polifenoles provenientes de las avellanas y de la vainillina que forman parte de su composición.

En la etapa oral, sólo una parte de los polifenoles libres iniciales se encuentra solubilizada (Figura 3.5). A continuación, se observa una liberación durante la etapa gástrica, superándose la cantidad inicial de polifenoles libres. Finalmente, en la etapa intestinal, los resultados indican que el conjunto de condiciones favorables, correspondiente a individuos sanos (Kreon© 0,48 mg/mL, pH 7 y concentración biliar 10 mM), actúa positivamente en la liberación de antioxidantes. En general, parece ser que la desestructuración mecánica, el tiempo de residencia bajo condiciones gastrointestinales favorables y la acción enzimática contribuyen positivamente a la liberación físico-química de los compuestos fenólicos. La excepción es el chocolate untable cuya solubilización de antioxidantes es parcial respecto al contenido inicial, a pesar de ser creciente a medida que se avanza en las etapas digestivas. Lo opuesto se aprecia en el chocolate blanco, que, a pesar del bajo contenido inicial de polifenoles, presenta una significativa liberación de los mismos, que alcanza su máximo valor en la etapa intestinal, siendo éste comparable al del chocolate con leche y untable. Este hecho puede ser resultado de los polifenoles retenidos en la manteca de cacao durante el proceso de separación de la pasta.

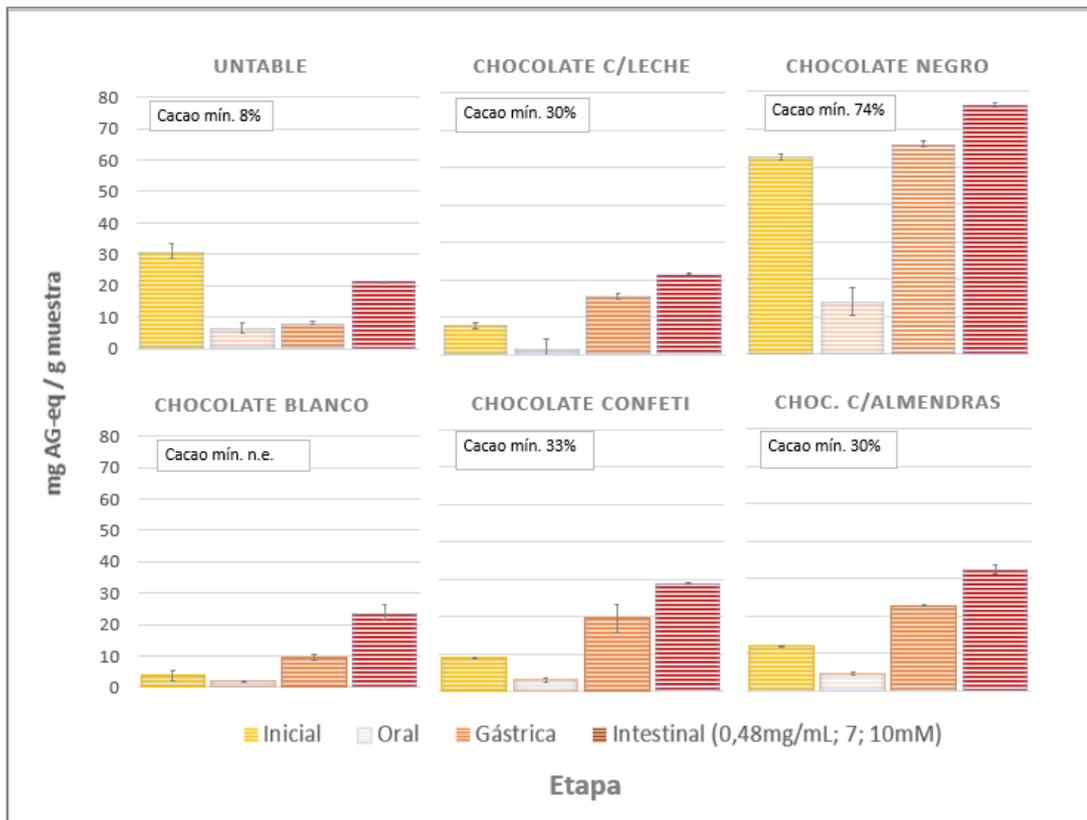


Figura 3.5. Contenido de polifenoles solubilizados (mg de ácido gálico (AG) equivalente / g producto) tras las etapas oral, gástrica e intestinal, bajo condiciones intestinales favorables (dosis de Kreon©=0,48 mg/mL / pH=7 y concentración biliar=10 mM) y desfavorables (dosis de Kreon©=0 mg/mL / pH=6 / concentración biliar=1 mM)

A una dosis fija de Kreon® (0,48 mg/mL), el efecto del pH duodenal (6 y 7) y de la concentración biliar (1 y 10 mM) (Figura 3.6), a pesar de presentar diferencias en la cantidad de polifenoles solubilizada (95% de confianza) (Tabla 3.6), no presentan una tendencia clara. En el caso del chocolate negro, blanco y con almendras, un pH 7 y una concentración baja de bilis, favorecen la liberación de polifenoles, mientras el chocolate unttable tiene un comportamiento distinto, al tenerse una mayor liberación a pH 6 con una concentración de bilis alta.

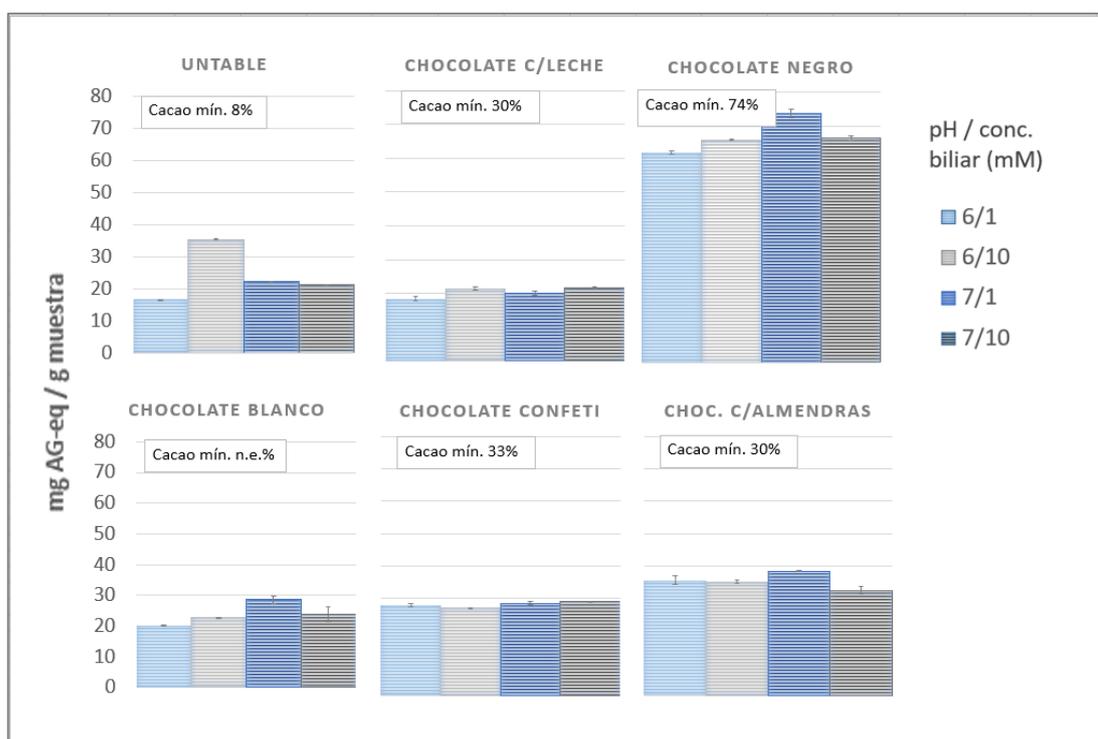


Figura 3.6. Liberación de polifenoles (mg AG equivalente / g alimento) en la etapa intestinal, en función al pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM), a una dosis de Kreon® (0,48 mg/mL) constante

Tabla 3.6. ANOVA multifactorial para la liberación y solubilización de polifenoles (mg AG equivalente / g alimento) en la etapa intestinal, en función a la muestra, pH intestinal (6 y 7) y concentración biliar (1 y 10 mM), bajo una dosis de Kreon® (0,48 mg/mL) constante

EFFECTOS PRINCIPALES	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:Muestra	12130,9	5	2426,17	2895,43	0,0000
B:pH	25,7108	1	25,7108	30,68	0,0000
C:Bilis	8,14277	1	8,14277	9,72	0,0047

En cuanto a la liberación y solubilización de compuestos fenólicos (mg AG equivalente/ g de alimento), en función a la dosis de Kreon®, a pH (6) y concentración biliar (1 mM) constantes (Figura 3.7), se observa un efecto positivo de la presencia de suplemento sobre el contenido soluble de polifenoles. La dosis de éste, sin embargo, fue relevante sólo para el chocolate unttable, chocolate negro y chocolate con almendras. Este hecho podría estar relacionado al mayor contenido graso del chocolate negro y chocolate con

almendras frente a los otros tipos de chocolate y a la composición lipídica específica del chocolate untable, lo cual podría representar una relación entre la hidrólisis lipídica y la liberación de polifenoles.

En función al contenido y bio-disponibilidad de polifenoles, la ingesta de chocolate negro presentaría un efecto positivo desde el punto de vista de la regulación de la glucólisis digestiva. Tal como indican otros estudios, serían los flavan-3-oles presentes en el cacao responsables de la inhibición de las α -amilasa y α -glucosidasa a nivel digestivo, efecto comparable al producido por la Acarbosa (fármaco hipoglucemiante), lográndose una inhibición del 53,6% en presencia de 500 μ g/mL de cacao (Ryan, Liyun, O’Keefe, & Neilson, 2016). Por otra parte, la ausencia de compuestos lácteos en el chocolate negro, puede resultar favorable ya que, a pesar de que no se ha determinado un efecto negativo de las proteínas en la liberación de polifenoles (Keogh, McInerney, & Clifton, 2007), se ha identificado una interferencia en la actividad antioxidante de los mismos en presencia de la α -caseína (Bourassa, Côté, Hutchandani, Samson, & Tajmir-Riahi, 2013) y la β -lactoglobulina de la leche por la formación de enlaces débiles entre estas proteínas y los polifenoles (Kanakakis, y otros, 2011). Otro chocolate con un contenido interesante de polifenoles es el chocolate con almendras, constituyendo una segunda mejor alternativa, después del chocolate negro.

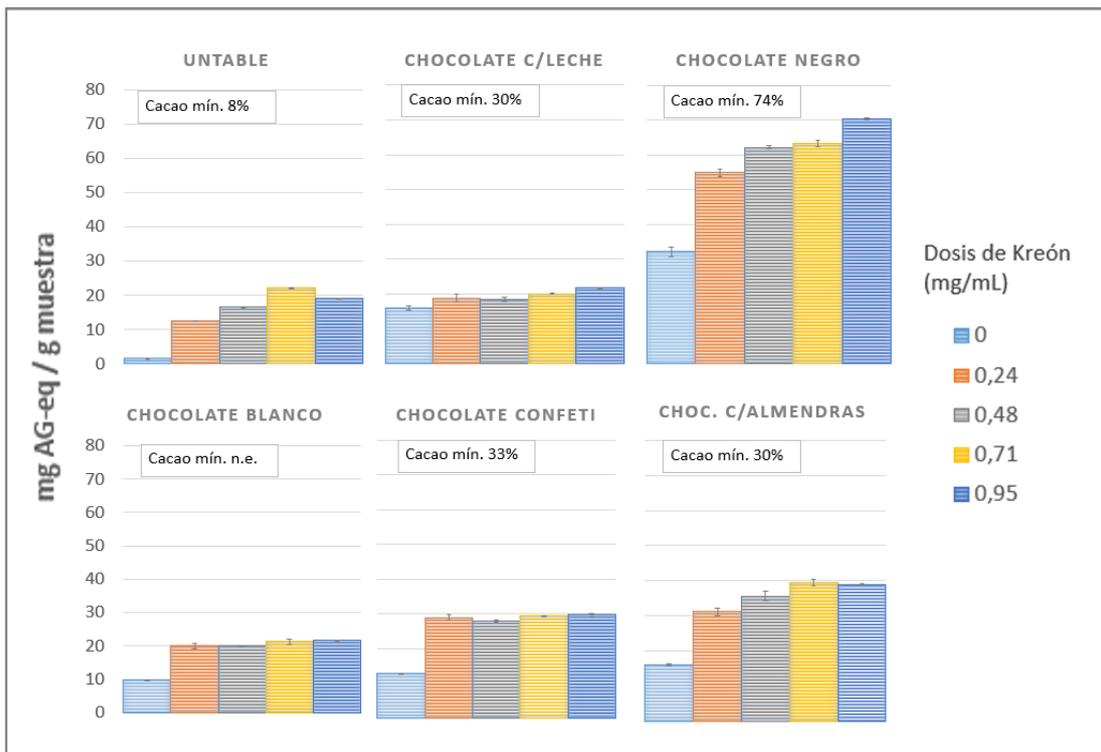


Figura 3.7: Liberación y solubilización de polifenoles (mg AG equivalente / g alimento) en la etapa intestinal, en función a la dosis de Kreon® (mg/mL), a pH intestinal (6) y concentración biliar (1 mM) constantes

4. CONCLUSIONES

Los chocolates analizados presentaron elevados índices de degradación de la matriz, relacionados con su contenido de azúcar y grasa, y no así con las condiciones intestinales.

La hidrólisis de los lípidos en este tipo de alimento mejora bajo suplementación enzimática con Kreon©, alcanzándose valores máximos de lipólisis a dosis específicas para cada tipo de chocolate, siendo que un incremento adicional en la dosis, a partir de este valor máximo, resulta desfavorable. El chocolate con leche fue aquel que presentó una mayor digestibilidad lipídica.

Se identificó una liberación de polifenoles durante las etapas gástrica e intestinal bajo condiciones de un individuo sano (dosis de Kreon 24mg/mL, pH 7 y concentración biliar 10 mM), siendo relevante la presencia de enzimática para la liberación y solubilización de antioxidantes, en todos los tipos de chocolates y siendo influyente la dosis sólo en el chocolate negro, con almendras y el chocolate untado. Se observa que esta liberación podría estar relacionada con el grado de lipólisis de las grasas. En este sentido, resultaría interesante profundizar en el estudio de la relación entre la digestibilidad de las grasas y la bio-accesibilidad de polifenoles en este tipo de matrices.

5. REFERENCIAS

Afoakwa, E. O., Paterson, A., & Fowler, M. (2007). Factors influencing rheological and textural qualities in chocolate - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 290-298.

Almoosawi, S., Tsang, C., Ostertag, L. M., Fyfed, L., & Al-Dujailid, E. A. (2012). Differential effect of polyphenol-rich dark chocolate on biomarkers of glucose metabolism and cardiovascular risk factors in healthy, overweight and obese subjects: a randomized clinical trial. *Food&Function*.

Álvarez, G. E., Murilo, A. W., Murillo, P. E., Rojano, B. A., & Méndez, A. J. (2016). Caracterización y extracción lipídica de las semillas del cacao amazónico (*Theobroma grandiflorum*). *Revista Ciencia en Desarrollo*, 7(1), 103-109. Recuperado el 2018

AOAC. (2000).

Benito-Gallo, P., Franceschetto, A., Wong, J. C., Marlow, M., Zann, V., Scholes, P., & Gershkovik, P. (2015). Chain length affects pancreatic lipase activity and the extent and pH–time profile of triglyceride lipolysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 353-362.

Bourassa, P., Côté, R., Hutchandani, S., Samson, G., & Tajmir-Riahi, H. (2013). The effect of milk alpha-casein on the antioxidant activity of tea polyphenols. *Photochemistry and Photobiology*, 128, 43-49. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.07.021

Canadian Digestive Health Foundation. (2018). *Canadian Digestive Health Foundation*. Obtenido de Pancreatic Exocrine Insufficiency.

Domínguez-Muñoz, J. E. (2011). Pancreatic Enzyme Therapy for Pancreatic Exocrine Insufficiency. *Gastroenterology&Hepatology*, 401-403.

European Commission. (2018). *MyCyFAPP*. Obtenido de <http://www.mycyfapp.eu/index.php/en/>

Fallingborg, J., Christensen, L., Ingeman-Nielsen, M., Jacobsen, B., Abildgaard, K., Rasmussen, H., & Rasmussen, S. (1990). Gastrointestinal pH and transit times in healthy subjects with ileostomy. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 247-253. doi:10.1111/j.1365-2036.1990.tb00469.x

Griffiths. (2014). *Lo Esencial en Aparato Digestivo* (4ta edición ed.). Elsevier.

Iqbal, J., & Hussain, M. M. (2009). Intestinal lipid absorption. *Endocrinology and Metabolism*, 1183-1194. doi:10.1152/ajpendo.90899.2008

Kanakis, C., Hasni, I., Bourassa, P., Tarantilis, P., Polissiou, M., & Tajmir-Riahi, H.-A. (2011). Milk β -lactoglobulin complexes with tea polyphenols. *Food Chemistry*, 127(3), 1046 - 1055. doi:10.1016/j.foodchem.2011.01.079

Keogh, J., McInerney, J., & Clifton, P. (2007). The Effect of Milk Protein on the Bioavailability of Cocoa Polyphenols. *Journal of Food Science*, 72(3), 230 - 233. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00314.x

Lamothe, Corbeil, Turgeon, & Britten. (2012). Influence of cheese matrix on lipid digestion in a simulated gastro-intestinal environment. *Food & Function*, 3(7), 2621-2631.

Liwei, Kelm, Hammerstone, Beecher, Holden, Haytowitz, . . . Prior. (2004). Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 613-617. Recuperado el 2018

Manach, C., Augustin, S., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Marze, S. (2014). A standardized static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food&Function*, 5, 1113-1124.

Osaka, N., Hoshi, J., Kudo, N., & Shibata, M. (2014). The flavan-3-ol fraction of cocoa powder suppressed changes associated with early-stage metabolic syndrome in high-fat diet-fed rats. *Life Sciences*, 114(1), 51-56.

Ryan, C., Liyun, Y., O'Keefe, S., & Neilson, A. P. (2016). Unfermented and Fermented Cocoa Extracts as Inhibitors of Pancreatic α -Amylase, α -Glucosidase, and Pancreatic Lipase. *The FASEB Journal*, 30(1).

Scattering, C. R. (2000). Pignol, David; Ayzavian, Laurence; Kerfelec, Brigitte; Timmins, Peter; Crenon, Isabelle; Hermoso, Juan; Fontecilla-Camps, Juan Carlos; Chapus, Catherine. *Journal of Biological Chemistry*, 4420-4224.

Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzymol.* 152-178.

U.S. Food and Drug Administration. (2009). CREON [package insert]. Marietta, GA, USA.

U.S. Food and Drug Administration. (2018). Obtenido de Code of Federal Regulations Title 21, Chapter I, Part 163 Cacao Products.

United States Department of Agriculture. (2018). Obtenido de National Nutrient Database for Standard Reference Release 28.