



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública,  
Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina  
Legal

Programa de doctorado Ciencias de la Alimentación

“BÚSQUEDA DE NUEVOS INGREDIENTES BIOACTIVOS EN  
OBESIDAD PARA EL DISEÑO DE NUEVOS ALIMENTOS  
FUNCIONALES, EN BASE A LA DEMANDA DEL  
CONSUMIDOR”

Memoria presentada por Esther Bataller Leiva

Directores de la tesis

Dra. Pilar D’Ocon Navaza

y

Dr. Alejandro Mollá Descals

Tutor de la tesis Dr. José Vicente Gil Ponce

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
POR LA UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Valencia, Septiembre 2015



La Dra. Pilar D'Ocon Navaza, Catedrática en Farmacología en la Facultad de Farmacia de la Universitat de València y el Dr. Alejandro Mollá Descals, Catedrático en Comercialización e Investigación de Mercados en la Facultad de Economía de la Universitat de València:

CERTIFICAN: Que Esther Bataller Leiva, Ingeniera Agrónoma por la Universidad Politécnica de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo que con el título: "Búsqueda de nuevos ingredientes bioactivos en obesidad para el diseño de nuevos alimentos funcionales, en base a la demanda del consumidor" presenta para optar al grado de doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia

14 de septiembre a 2015

Dra. Pilar D'Ocon Navaza

Dr. Alejandro Mollá Descals



A mi familia



*“Deja que el alimento sea tu medicina y tu medicina tu alimento”*

*(Hipócrates 460-370 a C)*





## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta tesis doctoral, no se concibe sin la ayuda, la colaboración, la comprensión, el cariño y el apoyo de personas e instituciones, que desde un punto de vista académico, investigador y personal han hecho posible que viera la luz. A todas ellas quiero, con estas palabras, mostrar mi agradecimiento.

Especialmente a la Dra. M<sup>a</sup> Pilar D'Ocon Navaza y al Dr. Alejandro Mollá Descals, directores de este trabajo y a los que quiero expresar mi más sincero agradecimiento por la confianza depositada durante este último periodo, por la excelente dirección y atención que me habéis dedicado y por recordarme que esto no es más que el principio de una nueva etapa. Gracias de corazón a los dos por, en muchos casos, haberme priorizado en vuestra ajetreada agenda y por haber sido el motor que ha permitido que culmine este trabajo. Nunca os voy a olvidar!! A Pilar, por su disponibilidad, comprensión y gran esfuerzo. Ha sido un enorme placer trabajar con ella y compartir nuestros puntos de vista durante mañanas y tardes en su despacho. A Alejandro, por acogerme en el momento más complicado, por sus palabras de apoyo, por su empuje, por su ilusión, por su orientación, por todas las facilidades que me ha dado, por su sensatez y por sus consejos.

También, deseo dar las gracias expresamente a las personas de la empresa Biópolis bajo cuya dirección y responsabilidad inicié este trabajo, al Dr. Daniel Ramón Vidal, Director Científico de la compañía, Salvador Genovés Martínez, Jefe de Departamento de Biotecnología Agroalimentaria y la Dra. Patricia Martorell, Jefa de laboratorio de Evaluación. Siempre os estaré muy agradecida por haberme permitido trabajar en las magníficas instalaciones de Biópolis para llevar a cabo toda la parte experimental de esta tesis y por haberme enseñado muchas de las nociones, sin las cuales, no habría podido desarrollar este trabajo. Si en algo fallé, os pido disculpas por no haber sabido hacerlo mejor.

Muchas gracias a todas las integrantes del laboratorio de Evaluación del Departamento de Biotecnología Agroalimentaria de Biópolis dónde se han llevado a cabo todos los ensayos de evaluación funcional con *C.elegans*, gracias por haber tratado con tanto cariño mis muestras! A todos los compañeros de Biopolis que han estado a mi lado cada día. Muchas gracias a Bea A, Marta T, Iryna, Bea C, Maria E, Violeta y Daniel Redón por vuestras palabras de ánimo y vuestros consejos siempre que los he necesitado. Gracias a Vero, Diego, Alex, Antonia, Dani, Guille, Marta B, Maria S, Silbia, Nuria, Silvia, Fernando, Ángela, Empar, Pepa, Meri, Aida, Rosa C, Rosa S, Ana, Lola, Jose, Vicky, David, Javi, Jose, Luis, Javier y al personal de LifeSequencing por todos esos momentos que hemos compartido.

Muchas gracias al Dr. José Vicente Gil por haber estado siempre atento en su papel como tutor y prestarme la ayuda necesaria en todo el proceso, al Dr. Jordi Mañes y al personal administrativo del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València, por su tiempo y orientación.

Quiero expresar también mi agradecimiento al trabajo realizado en la parte de análisis de datos del estudio de mercado por parte del Dr. Miguel Ángel Gómez Borja, y a Irene Zaera Cuadrado por su amistad, apoyo e ilusión dedicada a la elaboración e interpretación de los datos.

Tampoco quisiera olvidar la atención, ayuda y orientación del profesor Manuel Sanchis así como las visiones en relación a la innovación empresarial y tecnológica de los profesores Ignacio Fernández de Lucio, Francisco Más Verdú y José María García Álvarez-Coque.

Gracias también a la Asociación Valenciana de Dietistas y Nutricionistas de la Comunidad Valenciana (Codinucova) por las recomendaciones recibidas así como a todas las personas que han participado en la encuesta. Muchas gracias por vuestro tiempo!!

Finalmente, muchas gracias a mi familia, por su comprensión y por su total confianza en los momentos decisivos, gracias por apoyarme siempre y por darme todas las oportunidades posibles. A mi madre, por su eterna comprensión, amor, dulzura y por todo el tiempo que ha dedicado a este trabajo. A mi padre por su entrega, fortaleza y claro ejemplo a seguir. A mi hermana Marta, por estar ahí siempre ayudándome y dándome esa fuerza que me ayuda a levantarme. Gracias a mis abuelas Amparo y Trini por mantener vivo día a día este trabajo, por recordarme que hay que seguir adelante y todo tiene su recompensa. Gracias también al resto de la familia Bataller-Leiva, que nunca habéis dejado de mostrarme vuestro cariño y confianza. Especialmente gracias a mi tío Antonio y a mi tío Paco por vuestra disponibilidad, vuestros consejos y vuestros conocimientos aportados, así como a mi Number y a mi Cou por esa fuerza que transmitis día a día y nos permite seguir adelante.

Y por último, gracias a ti, Álvaro, por estar a mi lado desde el principio en esta aventura, por tu paciencia, tu eterna comprensión, tu amor y tu sacrificio....es una suerte haberte tenido tan cerca en todo este proceso.

Este es, inevitablemente, el final de una etapa y el comienzo de otra. Mucho ha sido lo aprendido y también muchos los errores cometidos, aunque con esfuerzo, entrega y sobre todo muchísima ilusión, he llegado a concluir esta Tesis Doctoral, que sin el apoyo de todos vosotros nunca habría logrado.

De corazón, muchísimas gracias a todos!!!!!!

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	5
I. La obesidad .....	7
1. Generalidades .....	7
2. Incidencia .....	8
3. Factores genéticos .....	12
4. El metabolismo energético .....	17
5. Importancia de la microbiota intestinal.....	19
6. Relación con las enfermedades cardiovasculares .....	21
7. Costes sociales y económicos .....	24
II. La alimentación funcional .....	25
1. Generalidades .....	25
2. Marco regulatorio .....	28
3. La alimentación funcional en obesidad .....	30
3.1. Marco regulatorio.....	30
3.2. Los compuestos funcionales en obesidad .....	32
3.2.1. Los macronutrientes.....	32
3.2.2. Los péptidos bioactivos .....	35
3.2.3. Los polifenoles .....	39
3.3. Métodos de evaluación funcional.....	40
3.3.1. Inhibición de la lipasa pancreática .....	40
3.3.2. El modelo <i>in vivo</i> de obesidad .....	42
4. El mercado de los alimentos funcionales: Proceso de desarrollo y lanzamiento de nuevos productos.....	43
4.1. El papel estratégico del consumidor .....	43
4.2. Motivos de éxito y fracaso en la introducción de nuevos	

alimentos funcionales.....	48
4.3. Comprensión del comportamiento de compra del consumidor de productos para la obesidad.....	51
4.4. Análisis del mercado de los productos actuales.....	53
4.4.1. Productos para el tratamiento farmacológico.....	53
4.4.2. Productos para el tratamiento preventivo.....	57
III. El cacao y sus propiedades saludables.....	62
1. El cacao: taxonomía, variedades y composición.....	62
2. La industria del cacao.....	63
2.1. Proceso de transformación de la semilla de cacao.....	63
2.2. Productos y subproductos generados.....	64
2.3. Propiedades nutritivas y sensoriales del chocolate.....	65
3. El mercado del cacao.....	66
4. El cacao y sus propiedades en la salud.....	69
4.1. Los polifenoles del cacao.....	69
4.1.1. Capacidad antioxidante de los polifenoles.....	69
4.1.2. Efecto de los polifenoles en la salud cardiovascular.....	70
4.1.3. Efecto de los polifenoles sobre las enfermedades neurodegenerativas.....	73
4.1.4. Efecto de los polifenoles en la obesidad.....	74
4.2. Las proteínas del cacao.....	75
OBJETIVOS.....	77
PRIMERA PARTE: El consumidor de productos de control de peso: un estudio empírico.....	81
Materiales y métodos.....	83
1. Muestra y procedimiento de obtención de datos.....	85

---

2. Estructura de la encuesta .....	86
Resultados y discusión .....	89
1. Descripción sociodemográfica de la muestra .....	91
2. Distribución del Índice de Masa Corporal .....	92
3. Análisis de los hábitos de los encuestados.....	95
4. Comportamientos y actitudes hacia los productos de control de peso corporal.....	97
4.1. Consumidores de productos de control de peso (grupo A).....	100
4.2. No consumidores de productos de control de peso (grupo B) .....	110
5. Preferencia de producto de control de peso .....	115
6. Formulación de un alimento funcional.....	118
SEGUNDA PARTE: Búsqueda de nuevos péptidos bioactivos del cacao para el diseño de nuevos alimentos funcionales en obesidad.....	121
Materiales y métodos.....	123
1. Muestra procedente del cacao seleccionada para la obtención de péptidos funcionales.....	125
2. Tratamiento de la muestra para la obtención de péptidos bioactivos.....	125
2.1. Preparación de la muestra e hidrólisis enzimática .....	125
2.2. Selección de los preparados enzimáticos .....	125
2.3. Optimización del preparado enzimático .....	126
2.4. Determinación de los parámetros de calidad .....	126
2.4.1. Análisis del contenido en proteínas y péptidos.....	126
2.4.2. Análisis del contenido en polifenoles .....	127
3. Compuestos antiobesidad .....	127
3.1. Hidrolizado proteico .....	127
3.2. Fracciones cromatográficas de purificación .....	127
3.2.1. Purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica....	127

3.2.2. Ultrafiltración por membranas de 10.000Da.....	128
3.2.3. Purificación por Cromatografía de Fase Inversa.....	128
3.3. Péptidos sintéticos. ....	128
4. Identificación de los péptidos funcionales .....	129
5. Estudio de las interferencias entre compuestos para el diseño de un posible alimento funcional.....	130
6. Método <i>in vitro</i> de inhibición de la actividad enzimática de la lipasa pancreática.....	131
7. Modelo simulado de digestión gastrointestinal .....	132
8. Estudio <i>in vivo</i> de reducción de grasa en <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	134
9. Análisis transcriptómico en <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	134
 Resultados y discusión.....	 137
1. Caracterización del Barquillo y obtención de los compuestos antiobesidad.....	139
1.1. Estudio de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática por el Barquillo.....	139
1.2. Hidrólisis enzimática para la obtención de péptidos bioactivos.....	139
1.3. Purificación e identificación de los péptidos responsables de la inhibición .....	140
1.4. Evaluación funcional <i>in vitro</i> de los compuestos antiobesidad .....	144
2. Estudio de la estabilidad de los compuestos funcionales tras su paso por un sistema simulado de digestión gastrointestinal .....	147
2.1. Estudio del péptido 13-mer.....	147
2.2. Estudio del péptido 9-mer .....	150
2.3. Estudio del hidrolizado proteico .....	152
3. Evaluación funcional <i>in vivo</i> de los compuestos antiobesidad con <i>C.elegans</i> .....	153
3.1. Estudio del péptido 13-mer.....	153
3.2. Estudio del péptido 9-mer .....	154
3.3. Estudio del hidrolizado proteico .....	155

---

3.4. Búsqueda de nuevas actividades del péptido 13-mer .....	156
4. Estudio de las interferencias entre compuestos para el diseño de un posible alimento funcional .....	158
4.1. Selección del ingrediente funcional .....	158
4.2. Caracterización de la matriz alimentaria a enriquecer .....	159
4.3. Evaluación funcional del producto obtenido .....	161
5. Limitaciones y futuras líneas de trabajo.....	165
CONCLUSIONES .....	169
ANEXOS .....	173
Anexo 1 .....	175
Anexo 2 .....	189
Anexo 3 .....	192
BIBLIOGRAFÍA.....	195





## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los distintos grados de obesidad en función del IMC según el consenso SEEDO´2000 .....	7
<b>Tabla 2.</b> Algunos de los genes asociados a la obesidad. ....	13
<b>Tabla 3.</b> Péptidos orexigénicos implicados en la estimulación del apetito.....	14
<b>Tabla 4.</b> Péptidos anorexigénicos implicados en la inhibición del apetito .....	15
<b>Tabla 5.</b> Áreas de interés en alimentación funcional .....	28
<b>Tabla 6.</b> Ejemplo de alimentos o ingredientes funcionales con alegación de FDA.....	30
<b>Tabla 7.</b> Ejemplo de alimentos o ingredientes funcionales con alegación de EFSA.....	30
<b>Tabla 8.</b> Efecto de diferentes ingredientes sobre el incremento o la reducción de péptidos orexigénicos y anorexigénicos implicados en la obesidad. ....	33
<b>Tabla 9.</b> Algunos péptidos e hidrolizados proteicos con capacidad de inhibir ECA. ....	37
<b>Tabla 10.</b> Algunos péptidos bioactivos con actividad funcional.....	38
<b>Tabla 11.</b> Buenas y malas prácticas de investigación en el desarrollo de nuevos productos.....	46
<b>Tabla 12.</b> Productos del mercado para la obesidad con capacidad de producir saciedad. ....	59
<b>Tabla 13.</b> Principales importadores de la UE de productos de cacao.....	67
<b>Tabla 14.</b> Publicaciones referentes al efecto de los polifenoles de cacao sobre la salud cardiovascular en los últimos años .....	70
<b>Tabla 15.</b> Características sociodemográficas de la muestra .....	91
<b>Tabla 16.</b> Distribución porcentual de la muestra en función del IMC. ....	92
<b>Tabla 17.</b> Tabla de tabulación cruzada entre edad (3 niveles) e IMC (2 niveles) ...	93

<b>Tabla 18.</b> Tabla de tabulación cruzada entre sexo (2 niveles) e IMC (2 niveles) ....	93
<b>Tabla 19.</b> Tabla de tabulación cruzada entre la renta (3 niveles) e IMC (2 niveles) .....	94
<b>Tabla 20.</b> Relación entre el consumo de productos de control de peso y las variables demográficas. ....	95
<b>Tabla 21.</b> Preferencia de consumo de productos de control de peso corporal. ....	100
<b>Tabla 22.</b> Relación consumo de medicamentos y características demográficas....	101
<b>Tabla 23.</b> Relación consumo de complementos nutricionales y características demográficas. ....	101
<b>Tabla 24.</b> Relación consumo de alimentos funcionales y características demográficas. ....	101
<b>Tabla 25.</b> Consumidores de alimento funcionales en USA y Europa en función de diferentes parámetros sociodemográficos .....	102
<b>Tabla 26.</b> Tabulación cruzada entre alimentos funcionales y complementos nutricionales. ....	102
<b>Tabla 27.</b> Tabulación cruzada entre alimentos funcionales y medicamentos.....	103
<b>Tabla 28.</b> Tabulación cruzada entre complementos nutricionales y medicamentos .....	103
<b>Tabla 29.</b> Responsable de la prescripción o recomendación de los productos de control de peso. ....	103
<b>Tabla 30.</b> Grado de satisfacción de los consumidores de productos de control de peso.....	105
<b>Tabla 31.</b> Importancia que el consumidor asigna a algunas características de los productos de control de peso. ....	106
<b>Tabla 32.</b> Razones para no consumir productos de control de peso.....	110
<b>Tabla 33.</b> Importancia asignada a factores por parte de los no consumidores .....	111
<b>Tabla 34.</b> Preferencia de producto para los consumidores y no consumidores. ....	116
<b>Tabla 35.</b> Disposición del consumidor y no consumidor a pagar más por un alimento funcional efectivo.....	116
<b>Tabla 36.</b> Análisis de la demanda de mayor oferta de este tipo de productos .....	116

---

<b>Tabla 37.</b> Preferencia de producto, para el consumidor y no consumidor .....	118
<b>Tabla 38.</b> Actividad inhibidora de la lipasa pancreática por las fracciones obtenidas de la cromatografía de fase inversa provenientes de la fracción 4 de la cromatografía de interacción hidrofóbica.....	141
<b>Tabla 39.</b> Actividad inhibidora de la lipasa pancreática por las fracciones obtenidas de la cromatografía de fase inversa provenientes de la fracción 5 de la cromatografía de interacción hidrofóbica.....	143
<b>Tabla 40.</b> Porcentaje de degradación del péptido 9-mer a lo largo de las distintas fases que simulan su paso por el tracto digestivo.....	151
<b>Tabla 41.</b> Resumen de los resultados obtenidos con los distintos productos sobre la inhibición de la lipasa pancreática y la acumulación de grasa en el modelo de <i>C elegans</i> . .....	156
<b>Tabla 42.</b> Rutas sobreexpresadas en los nematodos alimentados con 1µg/mL de péptido 13-mer.....	157
<b>Tabla 43.</b> Contenido polifenólico de las fracciones obtenidas tras la purificación del CCX45% ws.....	161
<b>Tabla 44.</b> Valor de $E_{max}$ e $IC_{50}$ por la fracción de péptidos inferior a 3.000Da del hidrolizado del Barquillo y la mezcla de dicha fracción con 1µg/mL de CCX 45% WS. ....	162



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ratios de obesidad en adultos (A) y en niños entre 5 y 17 años (B) en diferentes países del mundo. ....	9
<b>Figura 2.</b> Ratios de obesidad en adultos.....	9
<b>Figura 3.</b> Prevalencia de la obesidad en adultos en España.....	10
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de personas con sobrepeso y obesidad en la población española adulta.....	10
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de personas con sobrepeso y obesidad en función de su nacionalidad.....	11
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de personas con sobrepeso en la población española adulta en función de los estudios cursados. ....	11
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de personas obesas en la población española adulta en función de los estudios cursados. ....	11
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de personas con sobrepeso en la población española adulta en función de su situación laboral. ....	12
<b>Figura 9.</b> Porcentaje de personas obesas en la población española adulta en función de su situación laboral.....	12
<b>Figura 10.</b> Red funcional formada por señales neuronales y hormonales que regulan la ingesta alimentaria. ....	13
<b>Figura 11.</b> Sistema de señalización de la leptina en la regulación del balance energético. ....	16
<b>Figura 12.</b> Degradación del triglicérido y entrada de los ácidos grasos.....	17
<b>Figura 13.</b> Entrada de los ácidos grasos desde el citosol hasta la mitocondria a través del complejo carnitin-palmitoil transferasa .....	18
<b>Figura 14.</b> Oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria.....	18
<b>Figura 15.</b> Glucólisis e interacción entre la oxidación de los ácidos grasos y el piruvato.....	19

<b>Figura 16.</b> Mecanismos implicados en hipertensión: resistencia a la insulina (síndrome metabólico) o leptina (obesidad)-relación del sistema nervioso simpático (SNS), hiperactividad y la presión arterial .....	23
<b>Figura 17.</b> El mercado global de la obesidad (%).....	25
<b>Figura 18.</b> Herramientas utilizadas para validar la funcionalidad de un ingrediente.....	26
<b>Figura 19.</b> Clasificación de las familias de compuestos fenólicos.....	39
<b>Figura 20.</b> Mecanismo de acción de la lipasa pancreática .....	41
<b>Figura 21.</b> Listado parcial de las vías metabólicas de <i>C.elegans</i> en relación con la obesidad.....	43
<b>Figura 22:</b> Importancia relativa de las dimensiones de desarrollo de nuevos productos.....	45
<b>Figura 23.</b> Modelo de comportamiento hacia el producto y efecto de las expectativas del consumidor hacia la aceptación del mismo.....	48
<b>Figura 24.</b> Modelo de buenas prácticas para productos de control de peso .....	51
<b>Figura 25.</b> Incremento esperado de población mayor de 65 años en Estados Unidos .....	53
<b>Figura 26.</b> Mercado global en el tratamiento farmacológico de la obesidad .....	54
<b>Figura 27.</b> Tipos de tratamientos farmacológicos de la obesidad .....	55
<b>Figura 28.</b> Porcentaje de ingresos por país en tratamientos farmacológicos de la obesidad.....	55
<b>Figura 29.</b> Porcentaje de ingresos por fabricante .....	56
<b>Figura 30.</b> Mercado global para el tratamiento preventivo de la obesidad .....	57
<b>Figura 31.</b> Interior de un fruto de cacao con características de tipo criollo.....	62
<b>Figura 32.</b> Aspecto interno y externo de un fruto de cacao con características de tipo forastero .....	62
<b>Figura 33.</b> Diagrama tecnológico de la elaboración del chocolate y sus subproductos .....	64

<b>Figura 34.</b> Distribución de la producción de cacao en grano.....	67
<b>Figura 35.</b> Estructura de la encuesta planteada para la investigación de marketing.....	87
<b>Figura 36.</b> Distribución del IMC para los componentes de la muestra.....	92
<b>Figura 37.</b> Representación del IMC en hombres y mujeres por edades.....	94
<b>Figura 38.</b> Importancia de la alimentación en los sujetos de estudio.....	95
<b>Figura 39.</b> Hábitos en relación con el ejercicio físico en los sujetos de estudio.....	96
<b>Figura 40.</b> Hábitos en relación con realizar dieta o régimen especial en los sujetos de estudio.....	96
<b>Figura 41.</b> Consumo de productos de control de peso corporal.....	99
<b>Figura 42.</b> Satisfacción de los consumidores con el último producto consumido..	104
<b>Figura 43.</b> Importancia, según la escala de Likert, de que el producto se venda en farmacias.....	106
<b>Figura 44.</b> Importancia, según la escala de Likert, de que el producto se venda en supermercados.....	107
<b>Figura 45.</b> Importancia, según la escala de Likert, de que el producto se venda en herboristerías o centros de dietética.....	107
<b>Figura 46.</b> Importancia, según la escala de Likert, de que el producto se venda por internet.....	108
<b>Figura 47.</b> Importancia, según la escala de Likert, de que el producto tenga una efectividad científicamente demostrada.....	108
<b>Figura 48.</b> Importancia, según la escala de Likert, de que el producto tenga un buen etiquetado.....	109
<b>Figura 49.</b> Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto se vendiera en farmacias.....	112
<b>Figura 50.</b> Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto se vendiera en supermercados.....	112

<b>Figura 51.</b> Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto se vendiera en herboristerías o centros de dietética .....	113
<b>Figura 52.</b> Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto se vendiera por internet .....	113
<b>Figura 53.</b> Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto tuviera una efectividad científicamente demostrada .....	114
<b>Figura 54.</b> Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que hubiera más información acerca del producto .....	114
<b>Figura 55.</b> Preferencia de producto de control de peso corporal.....	115
<b>Figura 56.</b> Importancia de adicionar un ingrediente funcional procedente de la misma matriz .....	117
<b>Figura 57.</b> Importancia de adicionar un ingrediente funcional que provenga de otra matriz .....	117
<b>Figura 58.</b> Preferencia de producto para el consumidor y no consumidor de productos de control de peso .....	119
<b>Figura 59.</b> Selección del formato más adecuado para formular un alimento funcional a base de cacao a partir de los resultados de la investigación de marketing.....	120
<b>Figura 60.</b> Muestra de Barquillo obtenida de Natraceutical S.A.....	125
<b>Figura 61.</b> Certificado de análisis del producto comercial Cocoa Extract Water Soluble (CocoanOX 45%ws).....	131
<b>Figura 62.</b> Resultados de inhibición de LP por los sobrenadantes obtenidos en las diferentes condiciones de hidrólisis (** $P < 0,01$ vs Barquillo, $\Psi P < 0,05$ vs Barquillo + Termamyl® 120L + Alcalase®) .....	139
<b>Figura 63.</b> Cromatograma de interacción hidrofóbica del Barquillo hidrolizado (Rosa: OD 214nm; Azul: OD 280nm) .....	140
<b>Figura 64.</b> Cromatograma de fase inversa de la fracción 4 proveniente de la cromatografía de interacción hidrofóbica del Barquillo hidrolizado (Rosa: OD 214nm; Azul: OD 280nm) .....	141
<b>Figura 65.</b> Espectro de fragmentación del péptido funcional de 13-mer (DNYDNSAGKWWVT) identificado.....	142



<b>Figura 66.</b> Cromatograma de fase inversa de la fracción 5 proveniente de la cromatografía de interacción hidrofóbica del Barquillo hidrolizado (Rosa OD: 280 nm; Azul OD: 214 nm) .....	142
<b>Figura 67.</b> Resultados de identificación por MALDI-TOF de los péptidos presentes en la fracción 11 proveniente de la cromatografía de fase inversa .....	143
<b>Figura 68.</b> Secuencia de la albúmina (inhibidor de la tripsina) .....	143
<b>Figura 69.</b> Efecto de distintas concentraciones de Orlistat sobre la actividad de la lipasa pancreática .....	144
<b>Figura 70.</b> Efecto de distintas concentraciones del hidrolizado proteico del Barquillo sobre la actividad de la lipasa pancreática .....	145
<b>Figura 71.</b> Efecto de distintas concentraciones de la fracción inferior a 3.000Da proveniente del hidrolizado proteico del Barquillo sobre la actividad de la lipasa pancreática .....	145
<b>Figura 72.</b> Efecto de distintas concentraciones del péptido 13-mer sobre la actividad de la lipasa pancreática.....	146
<b>Figura 73.</b> Esquema del procedimiento seguido para la obtención de los compuestos funcionales del Barquillo y concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ) obtenida en los ensayos de inhibición de la actividad de la lipasa pancreática.....	147
<b>Figura 74.</b> Cromatograma correspondiente al paso del péptido 13-mer por la fase oral.....	148
<b>Figura 75.</b> Cromatograma correspondiente al paso del péptido 13-mer por la fase gástrica .....	148
<b>Figura 76.</b> Cromatograma conteniendo el péptido 13-mer sometido a la fase gástrica y el péptido 9-mer sintetizado.....	149
<b>Figura 77.</b> Cromatograma correspondiente al paso del péptido 13-mer por la fase intestinal.....	149
<b>Figura 78.</b> Cromatograma correspondiente al paso del péptido 9-mer por la fase oral.....	150
<b>Figura 79.</b> Cromatograma correspondiente al paso del péptido 9-mer por la fase gástrica .....	150

**Figura 80.** Cromatograma correspondiente al paso del péptido 9-mer por la fase intestinal.....151

**Figura 81.** Efecto de distintas concentraciones del péptido 9-mer sobre la actividad de la lipasa pancreática.....152

**Figura 82.** Cromatograma correspondiente al paso del hidrolizado proteico por la fase intestinal .....153

**Figura 83.** Porcentaje de fluorescencia presente en las muestras analizadas con la cepa salvaje N2 en condiciones control, en presencia de Orlistat (6µg/mL) o en presencia de 13-mer (1µg/mL).....154

**Figura 84.** Porcentaje de fluorescencia presente en las muestras analizadas con la cepa salvaje N2 en condiciones control, en presencia de Orlistat (6µg/mL) o en presencia de 9-mer a concentraciones 0,1µg/mL, 1µg/mL y 10µg/mL (\*\* P< 0,01 vs control, ΨΨ P< 0,01 vs Orlistat) .....154

**Figura 85.** Porcentaje de fluorescencia presente en las muestras analizadas con la cepa salvaje N2 en condiciones control, en presencia de Orlistat (6µg/mL) o en presencia del hidrolizado proteico a las concentraciones 0,6µg/mL, 1,2µg/mL, 6µg/mL y 60µg/mL (\*\* P< 0,01 vs control; ΨΨ P< 0,01 vs Orlistat).....155

**Figura 86.** Porcentaje de fluorescencia presente en las muestras analizadas con la cepa mutante tph-1 en condiciones control, en presencia de Orlistat (6µg/mL) o en presencia de 13-mer (1µg/mL).....158

**Figura 87.** Efecto de distintas concentraciones de CCX45% sobre la inhibición de la lipasa pancreática .....160

**Figura 88.** Efecto de distintas concentraciones de CCX45%ws sobre la inhibición de la lipasa pancreática .....160

**Figura 89.** Efecto de la combinación de distintas concentraciones de la fracción inferior a 3.000Da con 1µg/mL de CCX45%ws sobre la inhibición de la lipasa pancreática .....162

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4 MUO: 4-methumbelliferyl oleate

6GP: Glucosa 6-fosfato

A $\beta$ <sub>42</sub>: Péptido amiloide

ACC: Actyl –CoA carboxilasa

Acil-coA: Derivado de acilo

ACS: Acil-CoA sintasa

ACTH: Hormona adrenocorticotropa

ADENYD: Asociación de Diplomados en Enfermería de Nutrición y Dietética

ADIPOQ: Adiponectina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosin difosfato

ADRB: Receptor Adrenérgico

AEDN: Asociación Española de Dietistas y Nutricionistas

AEETCA: Asociación Española para el Estudio de los Trastornos de la Conducta Alimentaria

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

AG: Ácido graso

AGCC: Ácido graso de cadena corta

AgRP: Péptido relacionado al agouti

AMP: Adenosin monofosfato

AOA: Administratin on aging

ARN: Ácido ribonucleico

ASK1: Quinasa reguladora de la señal de la apoptosis 1

ATP: Adenosin trifosfato

ATPasa: ATP sintasa

BCA: Ácido bicinconínico

*C.elegans*: *Caenorhabditis elegans*

CACT: Carnitinaaciltranslocasa

CAE: Código Alimentario Español

CART: Tránsito regulado por cocaína y anfetamina

CAT: Carnitina acetiltransferasa

CCK: Colecistoquinina

CCX: CoccoanOX

CD36: Transportador de ácidos grasos

CGC: *Caenorhabditis* Genetic Center

CLA: Ácido linoleico conjugado

CMP: Proteína Quimioatrayente de Monocitos

CNIC: Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III

CNTF: Factor neurotrófico ciliar

Codinucova: Colegio Oficial de Dietistas y Nutricionistas de la Comunidad Valenciana

CPT: Carnitin- palmitol transferasa

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

CS: Citrato sintasa

CT: Tomografía computada

Cte: Cadena respiratoria

DEXA: Dual Energy X-Ray absorption ondas

DMSO: Dimetil sulfóxido

DRD2: Receptor 5-Hidroxitriptamina

E.coli: *Escherichia coli*

EAC: Enfermedades de las arterias coronarias

ECA: Enzima convertidora de angiotensina

EFSA: Agencia Europea de Seguridad Alimentaria

ENT: Enfermedades no transmisibles

ER: Retículo endoplásmico

EUFIC: Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación

FATP: Proteínas de unión a la membrana plasmática

FADH: Flavín adenín dinucleótido

FAS: Sintasa de ácidos grasos

FAT: Transportador de ácidos grasos (translocasas)

FDA: Food and Drug administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)

FESNAD: Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética

FUFOSE: Functional Food Science in Europe

GLP-1: Péptido análogo al glucagón

GLUT2: Transportador de glucosa

GMP: Glicomacropéptido

GRAS: Generally recognized as safe

HCA: Ácido hidroxicítrico

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

HIC: Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

HLPC: HighPerformance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

HSL: Lipasa sensible a hormonas

ICCO: Organización Internacional del Cacao

IC<sub>50</sub>: Concentración del Producto que inhibe el 50% de la Actividad Enzimática

IDO: Indolamina 2-3 dioxigenasa

IEFS: Institute of European Food Studies

IFIC: International Food Information Council

IFT: Instituto de Tecnología de los Alimentos

IL: Interleucina

ILSI: Life Science Institute (Instituto Internacional de Ciencias de la Vida)

IMC: Índice de masa corporal

IMS: In market surveillance

INE: Instituto Nacional de Estadística

INS: Insulina

ISO: Organización Internacional de Normalización

LCFA: Ácido graso de cadena larga

LC MS/MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LEP: Leptina

Lep-R: Resistencia a la leptina

LP: Lipasa pancreática

LPL: Lipoprotein lipasa

MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization

MAPK: Vía de la proteína quinasas activadas por mitógenos

MCH: Hormona concentradora de melanina

MCP1: Proteína quimioatrayente de monocitos

MCR: Receptor de Melanocortina

MME: Membrana mitocondrial externa

MMI: Membrana mitocondrial interna

MSH: Hormona estimulante de melanocitos

NADH: Nicotamida adenina dinucleótido

NADPH: Nicotamida adenina dinucleótido fosfato

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NG: Medio de cultivo del nematodo *C.elegans*

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

NPY: Neuropeptido Y

OECD: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

OX: Orexina

PAI1: Inhibidor del activador del plasminógeno

PASSCLAIM: Process of the Assessment of scientific support for claims on food

PDH: Complejo piruvato deshidrogenasa

PFK1: Fosfofructoquinasa

PLIN: Perilipina

PP: Polipéptido pancreático

POMC: Propiomelanocortina

PPAR $\gamma$ : Peroxisoma activado de los receptores gamma

PRL: Prolactina

PUFAS: Ácidos grasos poliinsaturados

PYY: Péptido tirosina-tirosina

QTL s: Quantitative trait loci

RAAS: Sistema Renina Angiotensina-aldosterona

RAS: Sistema renina-angiotensina

RETN: Resistina

RMA: Robust Multi-array Average

RMI: Resonancia magnética

RNA: Ácido ribonucleico

RPC: Cromatografía de fase inversa

RPR: Receptor provenin renin

SAA: Amiloide sérico A

SANDYD: Sociedad Andaluza de Nutrición Clínica y Dietética

SEDCA: Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación

SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad

SDC: Esteroil-coA desaturasa

SEEN: Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición

SEGHNP: Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica

SEN: Sociedad Española de Nutrición

SENPE: Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral

SGENM: Sociedad Gallega de Endocrinología, Nutrición y Metabolismo

SIRT-1: Sirtuina 1

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple

SNS: Sistema Nervioso Simpático

SRA: Sistema Renina Angiotensina

*T.cacao: Theobroma cacao*

TCA: Ácido tricloroacético

TDO: triptófano 2-3 dioxigenasa

TFA: Acido trifluoroacético

TG: Triglicéridos

TNF- : Factor de necrosis tumoral

TOF: Time of flight

TPH-1: mutante triptófano hidrolasa

TRH: Hormona liberadora de tirotropina

UCP: Proteína desacoplante mitocondrial

UE: Unión Europea

UV: Radiación Ultravioleta

VLDL: Proteína de muy baja densidad

WHO: World Health Organisation (Organización Mundial de la Salud)



# RESUMEN



## **“Búsqueda de nuevos ingredientes bioactivos en obesidad para el diseño de nuevos alimentos funcionales, en base a la demanda del consumidor”**

La innovación tecnológica en materia de salud ha sido un campo ampliamente estudiado y sigue siendo un foco de interés económico reiterado y prioritario. La alimentación es uno de los hábitos que más repercusión tienen en el estado de salud y en la prevención de determinadas enfermedades lo que influye cada vez más en los hábitos de compra de los consumidores (Niva M., 2007, Bech-Larsen T et al., 2007, Jones PJ et al., 2007, Van Kleef E et al., 2002). Un trastorno de la alimentación puede generar obesidad y con ello el desarrollo de múltiples complicaciones asociadas a la misma. En los últimos años, la Organización Mundial de la Salud (WHO., 2014 y 2015) ha venido alertando de la gran crisis de obesidad en Europa y la Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores de la Unión Europea ha identificado los desafíos críticos para la seguridad alimentaria analizando la evolución del consumo de alimentos funcionales en las próximas décadas para la prevención de determinadas enfermedades, entre ellas la obesidad (European Commission., 2013).

Según datos de la WHO, en España se espera en 2030, un incremento del porcentaje de personas obesas (36% hombres, 21% mujeres) y con sobrepeso (80% hombres, 58% mujeres). Es por ello por lo que el desarrollo de medidas adecuadas que combatan el problema y frenen la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles asociadas a la misma, es una necesidad inmediata. Una de las alternativas para revertir la obesidad es su prevención a través de un estilo de vida saludable y una dieta equilibrada, pudiendo llegar a completarse con el consumo de determinados alimentos funcionales o complementos nutricionales para el control del peso.

A la hora de seleccionar un nuevo ingrediente bioactivo para el diseño de productos innovadores con valor añadido, no sólo es necesario llevar a cabo unos estudios rigurosos que demuestren la efectividad del compuesto, sino también es importante conocer la opinión del consumidor de estos productos para poder cumplir con sus expectativas y conocer su grado de satisfacción sobre los productos existentes. Por ello, durante el desarrollo de este trabajo hemos evaluado, en primer lugar, la demanda del consumidor respecto a los productos de control de peso corporal y la valoración que los consumidores hacen sobre algunas de las características de los productos actualmente en el mercado. Asimismo, se ha analizado el comportamiento de compra del consumidor y se ha observado que más de la mitad de la muestra analizada ha consumido en alguna ocasión alimentos funcionales, complementos nutricionales o fármacos para controlar su peso corporal, siendo el primero de ellos el formato más seleccionado. En las condiciones ensayadas se ha observado que los factores más valorados por los consumidores están directamente relacionados con las propiedades funcionales del producto y su efectividad, aunque se han observado diferencias en las

opciones de compra en función de los distintos canales de distribución de estos productos y de las características sociodemográficas. Del mismo modo, se ha evaluado el grado de satisfacción de los consumidores respecto a los productos actualmente disponibles así como los principales motivos que producen el rechazo de estos productos por parte de los no consumidores. Se ha detectado un grado de insatisfacción destacable, por parte de los primeros, y una falta de necesidad de controlar su peso así como una baja credibilidad en estos productos, por parte de los segundos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la investigación de marketing y considerando que el proceso de desarrollo y lanzamiento de nuevos productos es una necesidad primordial desde el punto de vista empresarial, la búsqueda de nuevos ingredientes bioactivos, basados en la evidencia científica, para enriquecer un alimento y dotarlo de propiedades funcionales, es una alternativa a considerar a la hora de desarrollar un producto innovador que satisfaga la demanda del consumidor y un nicho de interés para las empresas del sector alimentario. Por ello, a lo largo de este trabajo, se ha llevado a cabo, en segundo lugar, una investigación científica que ha permitido identificar ciertos compuestos funcionales del cacao con una actividad determinada en obesidad. Concretamente se han evaluado aquellos compuestos capaces de inhibir la lipasa pancreática *in vitro* y reducir la grasa corporal en un modelo *in vivo*. En las condiciones ensayadas, se ha identificado un hidrolizado proteico obtenido de la hidrólisis enzimática de un subproducto del cacao conteniendo un péptido funcional (DNYDNSAGKWWVT) capaz de inhibir la lipasa pancreática y activar el metabolismo del triptófano. Este hidrolizado, o la fracción peptídica inferior a 3.000Da conteniendo dicho péptido, podría utilizarse en el diseño de un posible producto para la obesidad, ya que tiene actividad funcional en estudios *in vitro*, con resultados similares a los de algunos extractos descritos en la literatura científica, así como porcentajes de reducción de la grasa corporal *in vivo*, con valores cercanos a los observados con el principal fármaco utilizado para la obesidad (Orlistat). Los resultados obtenidos de estas investigaciones favorecen el posible uso de subproductos de la industria alimentaria como fuente de péptidos bioactivos en obesidad y su posible aplicación para la formulación de productos innovadores, atendiendo a las demandas del mercado y siguiendo las directrices que marca el Reglamento Europeo (CE) Nº. 1924/2006.

# INTRODUCCIÓN



## I. LA OBESIDAD

### 1. Generalidades

La obesidad es una enfermedad crónica caracterizada por una acumulación excesiva de grasa o hipertrofia del tejido adiposo, causada por un desequilibrio entre la energía ingerida y la gastada. Se trata de una enfermedad de gran trascendencia sociosanitaria y económica que se diagnostica a partir de un Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a  $30\text{kg/m}^2$  (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de los distintos grados de obesidad en función del IMC según el consenso SEEDO 2000.

Individuo con:	IMC ( $\text{kg/m}^2$ )
Peso insuficiente	<18,5
Peso normal	18,5-24,9
Sobrepeso tipo I	25-26,9
Sobrepeso tipo II	27-29,9
Obesidad tipo I	30-34,9
Obesidad tipo II	35-39,9
Obesidad mórbida	40-40,9
Obesidad extrema	>50

El tejido adiposo es un órgano endocrino de origen mesenquimal implicado en numerosos procesos metabólicos responsables de la liberación de ciertas sustancias que ejercen efectos a nivel local y sistémico. Dentro del tejido adiposo, el tejido adiposo blanco ejerce una función de protección y sostén, acumulando el exceso de energía en forma de triglicéridos y liberándolos en forma de ácidos grasos libres a otros órganos, como el tejido adiposo marrón donde tiene lugar la generación de calor por reacciones metabólicas o termogénesis.

La hipertrofia de los adipocitos desencadena la producción de una gran variedad de moléculas que modulan una situación de inflamación crónica (Ortega FJ *et al.*, 2013). Esta se manifiesta por un aumento de los marcadores clásicos como la proteína C-reactiva, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL6), el amiloide sérico A (SAA), la resistina, la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) o el fibrinógeno, que desencadenan una cascada de reacciones que conllevan un aumento en la infiltración de monocitos y

una acumulación de macrófagos, productores de factores quimiotácticos atrayentes de otros macrófagos. Esto perpetúa el estado proinflamatorio de la obesidad mediado por el tejido adiposo (Bonomini F et al., 2015).

El incremento del tejido adiposo afecta también al metabolismo de la glucosa, reduciendo la utilización de la misma al competir con los ácidos grasos libres generados. La incapacidad del tejido adiposo para actuar como almacén de energía da lugar a un incremento de la grasa en el hígado, el corazón o las células  $\beta$ -pancreáticas ocasionando alteraciones metabólicas que contribuyen a la hiperinsulinemia y resistencia insulínica. Otros trastornos metabólicos asociados a la obesidad incluyen la hipertensión arterial y la dislipidemia aterogénica caracterizada por una elevación sérica de triglicéridos y una disminución de partículas de alta densidad (HDL), traducida en una elevación de la presión sanguínea.

Este conjunto de desórdenes mediados por una inflamación permiten clasificar a la obesidad como un problema determinante del Síndrome Metabólico (Haffner SM., 2005; Maury E et al., 2010), que se define como una agrupación de factores de riesgo de origen metabólico interrelacionados que incluyen la intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, obesidad abdominal, dislipemia aterogénica y elevación de la presión sanguínea, y entre ellos parece existir un mecanismo subyacente común (Eckel RH *et al.*, 2005). Los individuos que presentan este síndrome tienen incrementado el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, así como desarrollar diabetes tipo 2.

## 2. Incidencia

El análisis de la prevalencia de obesidad en el mundo empezó con el proyecto WHO MONICA (World Health Organization, Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) entre 1983 y 1986. Los resultados mostraron una mayor incidencia de la obesidad en los países mediterráneos y del este, en comparación con los países del norte y centro-oeste europeo. En años posteriores, el Institute of European Food Studies (IEFS) promovió un estudio pan-europeo con el objetivo de determinar la proporción y características socio-demográficas de la población obesa, así como sus actitudes hacia la alimentación y el ejercicio físico (Berghöfer A et al., 2008).

A lo largo del último siglo, se han identificado en el mundo 1,9 mil millones de adultos de más de 18 años con sobrepeso y 600 millones con obesidad (WHO., 2015). Respecto a los niños, 42 millones de niños de menos de 5 años de edad tenían sobrepeso en 2013 y más de la mitad de la población total vive en países donde la obesidad y el sobrepeso son causa de mortalidad (WHO., 2014).

A nivel geográfico, Estados Unidos, México, Australia y Nueva Zelanda son los países donde prevalece un mayor índice de obesidad, pese a que los datos de los últimos años



en Corea, Suiza, Italia, Hungría, Inglaterra, España, Irlanda, Canadá, Francia y Estados Unidos han aumentado significativamente (Figura 1, 2 y 3).

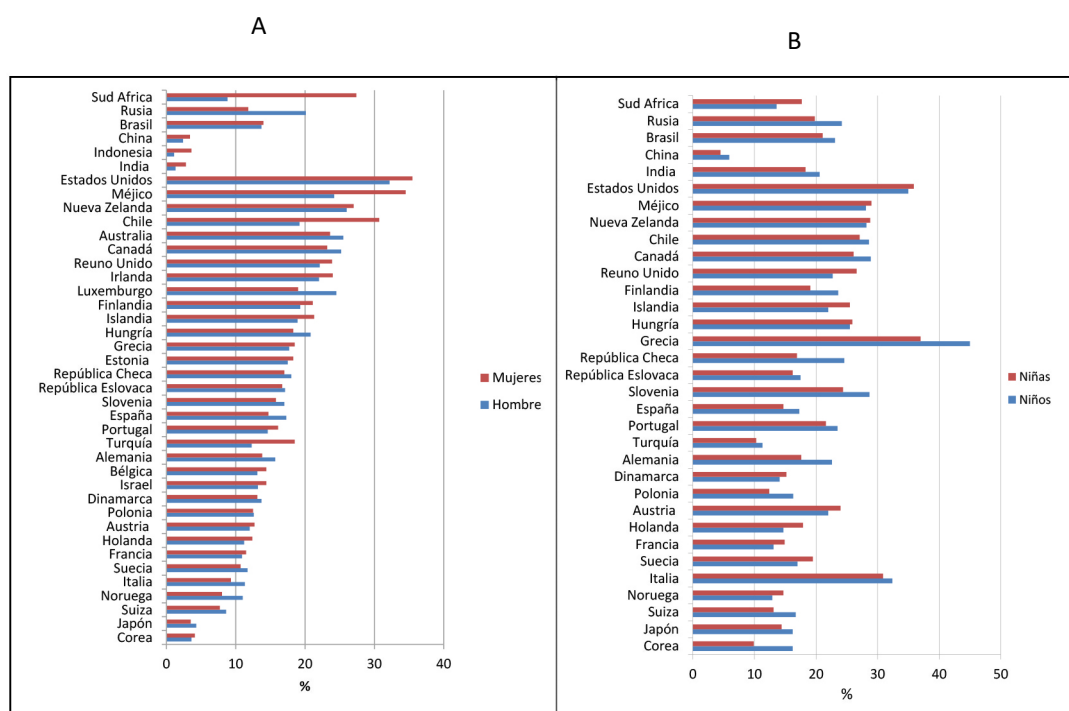


Figura 1. Ratios de obesidad en adultos (A) y en niños entre 5 y 17 años (B) en diferentes países del mundo (OECD Health Data., 2011 y Obesity Update., 2012).

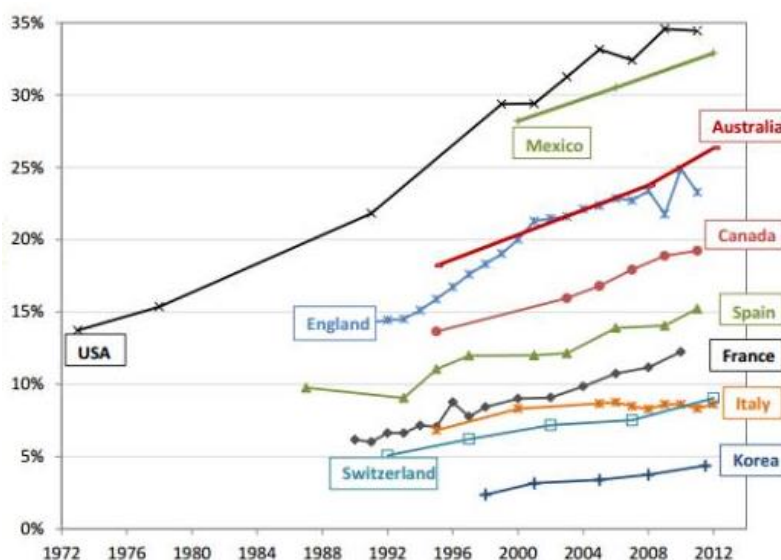
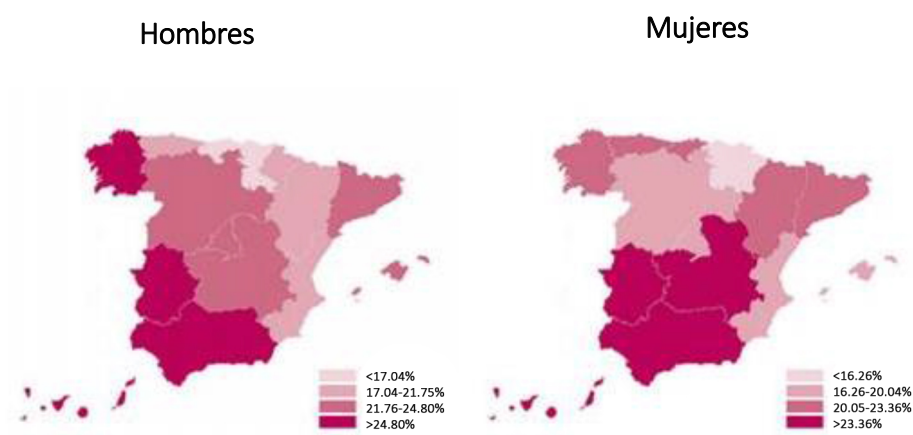


Figura 2. Ratios de obesidad en adultos (OECD Obesity Update., 2014).

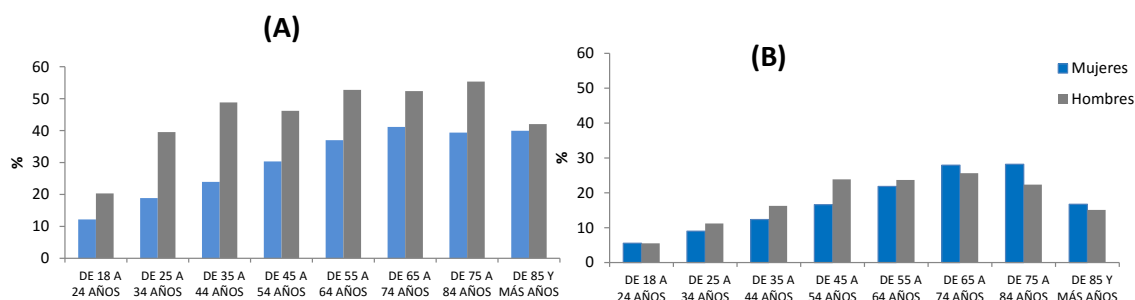
Respecto a España, la prevalencia se ha duplicado en los últimos 15 años y los resultados de la encuesta del Instituto Nacional de Estadística (INE., 2012) del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, realizada a 21.007 adultos de 18

años o más y 5.495 de menos de 18 años, residentes en el territorio nacional, revelan que el 17% de los adultos son obesos y el 37% tienen sobrepeso, siendo estos valores más altos en el sur y en el oeste de la península para los hombres y en el centro y el sur de la península para las mujeres (Figura 3). Respecto a los niños, entre 2 y 17 años, el 20% tienen sobrepeso y más del 10% son obesos (Encuesta Nacional de Salud 2011-2012).

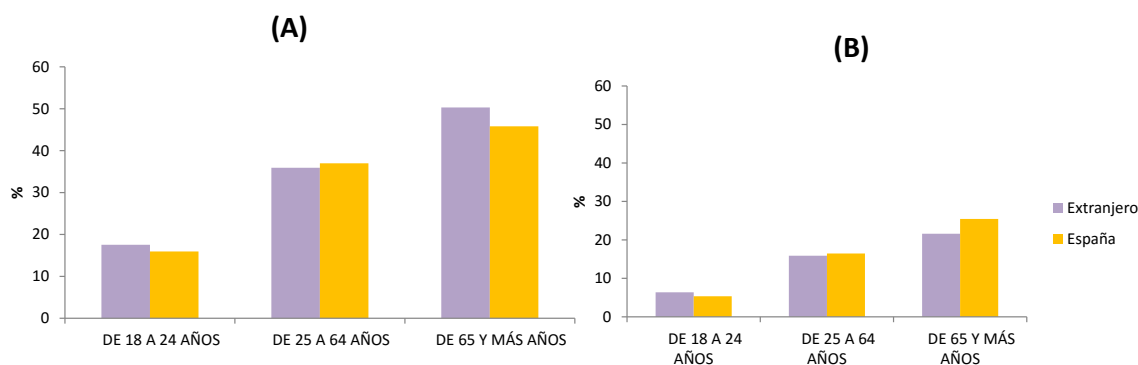


**Figura 3.** Prevalencia de la obesidad en adultos en España (Gutiérrez –Fisac JL et al., 2012).

Según el INE, en España, los hombres acumulan más grasa corporal que las mujeres, sobre todo entre los 35 y los 84 años de edad, no obstante la mujer es más obesa que el hombre a partir de 65 años (Figura 4) y no se observan diferencias entre los españoles y extranjeros residentes en España (Figura 5).

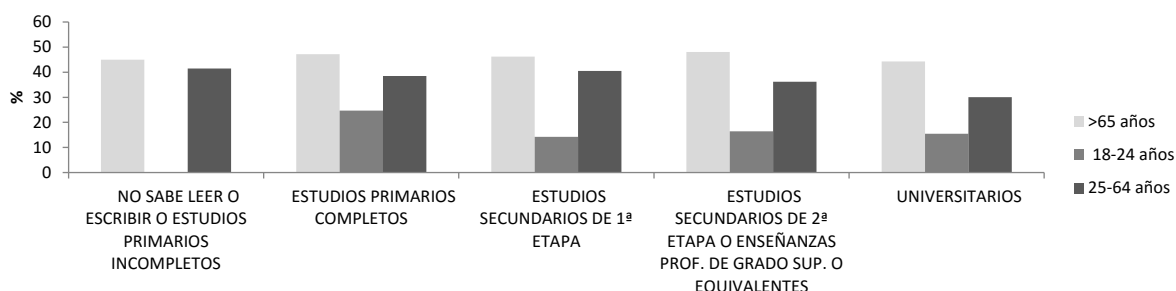


**Figura 4.** Porcentaje de personas con sobrepeso (A) y obesidad (B) en la población española adulta (INE., 2012).

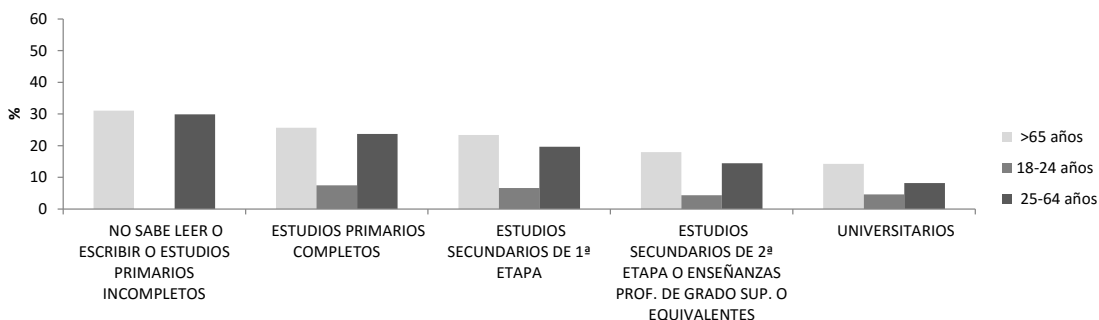


**Figura 5.** Porcentaje de personas con sobrepeso y obesidad en función de su nacionalidad (INE., 2012).

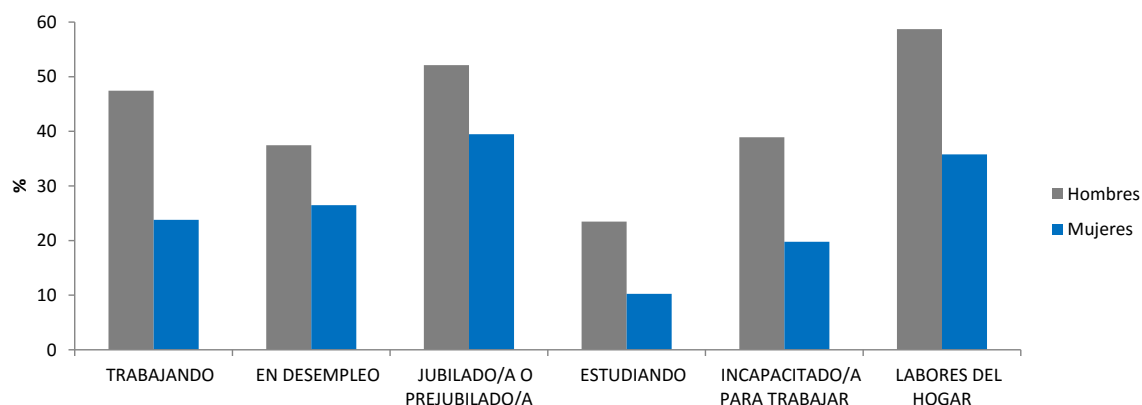
El grado de educación recibida (Figuras 6 y 7) así como la situación laboral (Figuras 8 y 9) son factores a tener en cuenta en el desarrollo del sobrepeso y la obesidad. Concretamente, en personas mayores de 65 años, el sobrepeso no se ve afectado por los estudios cursados pero si en personas entre 18-64 años donde se ve disminuida a medida que se ha obtenido mayor formación académica. En cuanto a la obesidad, la formación influye en todos los rangos de edad.



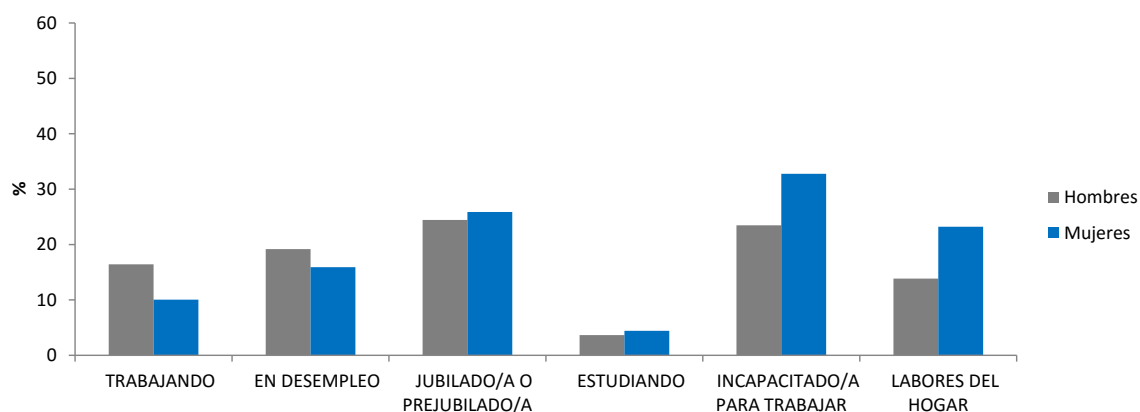
**Figura 6.** Porcentaje de personas con sobrepeso en la población española adulta en función de los estudios cursados (INE., 2012).



**Figura 7.** Porcentaje de personas obesas en la población española adulta en función de los estudios cursados (INE., 2012).



**Figura 8.** Porcentaje de personas con sobrepeso en la población española adulta en función de su situación laboral (INE., 2012).



**Figura 9.** Porcentaje de personas obesas en la población española adulta en función de su situación laboral (INE., 2012).

Respecto a la situación laboral, los estudiantes, tanto hombres como mujeres, presentan un ratio inferior de obesidad y sobrepeso. Este último es mayor en hombres en cualquier situación laboral en la que se encuentren y únicamente al mujer jubilada o prejubilada, incapacitada para trabajar o ejerciendo labores del hogar, presenta índices de obesidad mayor que el hombre.

### 3. Factores genéticos

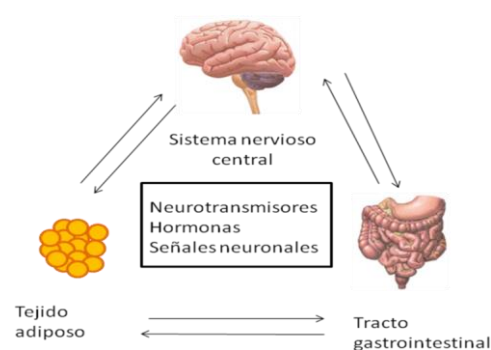
Se han descrito más de 430 genes y regiones cromosómicas que participan en la regulación del apetito, la termogénesis y la adipogénesis (Rankinen T et al., 2012). El mapa genético de la obesidad humana reporta la existencia de 253 QTLs identificados en 61 escrutinios del genoma completo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Algunos de los genes asociados a la obesidad (Rankinen T et al., 2012).

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Localización cromosómica</b>
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina	17q24.1
ADIPOQ	Adiponectina	3q27
ADRB2	Receptor adrenérgico $\beta$ -2	5q31
ADRB3	Receptor adrenérgico $\beta$ -3	8p12
DRD2	Receptor de dopamina D2	11q23
HTR2C	Receptor 5-hidroxitriptamina (serotonina) 2C	xq24
IL6	Interleucina 6	7p21
INS	Insulina	11p15
LDLR	Receptor de lipoproteínas de baja densidad	19p13
LEP	Leptina	7q31
LEPR	Receptor de leptina	1p31
MC4R	Rceptor de melanocortina 4	18q22
PLIN	Perilipina	15q26
PPAR $\gamma$	Receptor de peroxisoma-proliferador activado	3q25
RETN	gama Resistina	19q13
TNF	Factor de necrosis tumoral	6p21
UCP1	Proteína desacoplante 1	4q28
UCP2	Proteína desacoplante 2	11q13

Todos estos genes regulan los mecanismos que controlan la ecuación del balance energético donde participan la ingesta y el gasto calórico.

Por un lado, respecto a la ingesta de alimentos, el apetito se produce por interacciones entre las señales periféricas tanto en el plasma, como en los adipocitos siendo analizadas por el sistema nervioso central (SNC) (Figura 10).



**Figura 10.** Red funcional formada por señales neuronales y hormonales que regulan la ingesta alimentaria (Figura de elaboración propia a partir de Salvador J et al., 2005).

La regulación de la ingesta de alimentos es el resultado de una serie de señales hormonales y neuronales que se originan en el tracto gastrointestinal como respuesta a

las propiedades mecánicas y químicas de los alimentos ingeridos (Cumming DE et al., 2007). Diferentes órganos del tracto gastrointestinal, incluidos el estómago, el intestino delgado distal, el colon y el páncreas están implicados en este proceso, siendo todos ellos importantes en las diferentes fases de la regulación (Blundell JE et al., 2002). Dentro del sistema nervioso central, el hipotálamo regula esta homeostasis de energía proveniente del tracto gastrointestinal, influyendo directamente sobre el apetito y liberando neuropéptidos específicos utilizados en terapias antiobesidad (Berthoud HR 2003; Cumming DE et al., 2007). Algunas de estas moléculas activas, en el binomio apetito-saciedad, se muestran en las Tablas 3 y 4.

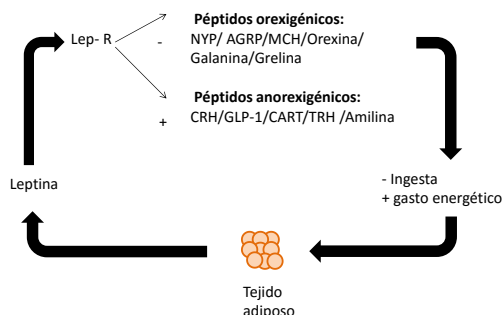
**Tabla 3.** Péptidos orexigénicos implicados en la estimulación del apetito (Tabla de elaboración propia a partir de Wren AM et al., 2001; Druce MR et al., 2005 y 2006).

Compuestos	Procedencia	Nombres	Características	Receptor
Péptidos orexigénicos	Señales procedentes del tracto gastrointestinal	Grelina	Se sintetiza en el estómago y es la única hormona gastrointestinal que estimula el apetito También se expresa en el intestino, los testículos, la hipófisis, la placenta, el hígado y los linfocitos Actúa a través de diferentes mecanismos destacando su efecto sobre el núcleo arcuato del hipotálamo, donde se encuentra el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP).	GSH-R está ampliamente distribuido por el organismo incluyendo el miocardio, los vasos sanguíneos, el hígado y el pulmón
	Señales procedentes del Sistema Nervioso Central (SNC)	Neuropéptido Y (NPY)	Neuropéptido más abundante del sistema nervioso central (SNC)	Y1-Y5 son los receptores para NYP; Y2 para PYY e Y4 para PP.
			Producido en varios núcleos neuronales y expresado en ARC donde se localiza con AgRP desde donde se proyecta a otros núcleos hipotalámicos	
			Forma parte de la familia de los péptidos intestinales YY (PYY) y de los polipéptidos pancreáticos (PP)	
		Hormona concentradora de melanina (MCH)	Se expresa en el hipotálamo, durante el ayuno y en personas obesas	MCH1R se expresa en tejidos centrales y periféricos por lo que está implicada en muchos procesos fisiológicos
		Galanina	Es un polipéptido de 29 aminoácidos que se distribuye en el cerebro principalmente en el hipotálamo y en el hipocampo y se sintetiza en el núcleo arcuato.	Se han descrito dos receptores para galanina (1 y 2) que pertenecen a la familia de la proteína G
Orexina	Aunque estos péptidos son producidos por una muy pequeña cantidad de células en el hipotálamo lateral y posterior, envían proyecciones a todas partes del cerebro	Los péptidos de orexina se ligan a las dos proteínas receptoras de orexinas acopladas a proteínas G, OX1 y OX2. La orexina-A se liga en ambos receptores OX1 y OX2 con aproximadamente la misma afinidad, mientras que la orexina-B se liga principalmente con la OX2, siendo 5 veces menos potente el enlace con OX1.		
Péptido relacionado al agouti (AGRP)	Neuropéptido producido en el cerebro por la neurona AgRP/NPY.	Es un agonista inverso de los receptores de melanocortina, específicamente, MC3-R y MC4-R.		

**Tabla 4.** Péptidos anorexigénicos implicados en la inhibición del apetito (Tabla de elaboración propia a partir de Drucker DJ., 2006; Cummings DE et al., 2007; Zhang JV et al., 2005; Lagaud GJ et al., 2007; Cooper GJS et al., 1987; Lutz TA et al., 1995 y 2006; Reda TK et al., 2002).

Compuestos	Procedencia	Nombres	Características	Receptor
Péptidos anorexigénicos	Señales procedentes del tracto gastrointestinal	Péptido análogo al glucagón (GLP-1)	Además de aumentar la secreción de insulina, suprime la secreción de glucagón del páncreas, incrementa la masa de las células beta y la expresión del gen de la insulina, inhibe la secreción de ácido estomacal y el vaciado gástrico y suprime la ingesta de alimento por medio de la sensación de saciedad.	Receptores acoplados a proteínas G y se expresan en las células beta del páncreas
		Colecistoquinina (CCK)	Péptido segregado por las células enteroendocrinas de la mucosa duodeno-yeyunal que se encuentra en diversas formas moleculares (CCK-58; CCK-33; CCK-8). Su acción puede inhibir la secreción de NPY en el hipotálamo y también se relaciona con ansiedad, comportamiento sexual, memoria, dolor y aprendizaje	CCK1 localizado en el tracto digestivo y CCK2 en el sistema nervioso
		Péptido tirosina-tirosina (PYY)	Es un miembro de la familia del polipéptido pancreático (PP) y, al igual que GLP-1, es sintetizado por las células L del íleon distal y el colon y es segregado en respuesta a la ingesta de alimentos	Receptor postsináptico Y2 localizado en las neuronas productoras de NPY
	Señales procedentes del Sistema Nervioso Central (SNC)	Melanocortinas	Incluye la hormona estimulante de melanocitos (MSH) y la hormona adrenocorticotropa (ACTH) Se producen a partir de la proopiomelanocortina (POMC) en la hipófisis Reduce la ingesta de alimentos	MC1R-MC5R; el receptor MC14 reduce la ingesta de alimentos al inyectarse
		Factor neurotrófico ciliar (CNTF)	Induce la pérdida de peso Comparte componentes moleculares con la leptina (factor de transcripción STAT3)	Están en el hipotálamo
		Amilina	Péptido hormonal secretado por las células $\beta$ -pancreáticas que junto a la insulina, controla los niveles de glucosa en sangre	Parece que hay por lo menos tres complejos de receptores que se unen a la amilina con alta afinidad. Los tres complejos contienen un receptor de calcitonina en su núcleo, más una de tres proteínas modificantes de la actividad receptora, RAMP1, RAMP2, o RAMP3
		Hormona liberadora de corticotropina (CRH)	Hormona peptídica y neurotransmisor involucrado en la respuesta al estrés, es la encargada de activar la secreción hipofisiaria de ACTH. Es sintetizada en el hipotálamo y llega a las células productoras de ACTH de la hipófisis anterior a través del sistema portahipofisario estimulando la síntesis y secreción del cortisol	Actúa fijándose a receptores específicos de las células corticotrópicas y solo estimula la liberación en presencia de calcio
		Transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART)	Se expresa en el núcleo arqueado, en las mismas neuronas que la POMC	--
		Hormona liberadora de tirotrópina (TRH)	Hormona peptídica producida en el área hipotalámica anterior en el núcleo paraventricular. TRH o TSHRH también puede ser encontrada en la hipófisis anterior, en otras zonas del cerebro, la médula espinal y en el aparato gastrointestinal	El receptor de TSHRH es un receptor acoplado a proteína $G_q$ que determina el incremento del calcio citoplasmático libre. Además, estimula la formación de ARNm que codifica para la prolactina (PRL)

Entre el conjunto de moléculas que controlan la homeostasis del estado nutricional, la leptina juega un papel determinante en la regulación y en el control de la obesidad (Figura 11).



**Figura 11.** Sistema de señalización de la leptina en la regulación del balance energético (Picó C et al., 2006).

La leptina es una proteína de 16KDa codificada por el gen *ob* producida por el tejido adiposo que estimula el gasto energético y reduce el apetito. Actúa como indicador, a largo plazo, de la cantidad de grasa almacenada y su acción sobre el comportamiento alimentario tiene lugar en el hipotálamo, donde estimula los dos grupos de neuronas presentes en el núcleo arcuato, controlando el metabolismo y regulando el hambre. Una deficiencia en la señalización por leptina, conduce a una sobrealimentación y puede producir algunas formas de obesidad (Canale MP et al., 2013). Muchos obesos tienen altas concentraciones de leptina en suero, ya que la unión de esta hormona a sus receptores no produce la señal adecuada en el cerebro y por lo tanto influye en los efectos de otros neuropéptidos que son mediados por dos mecanismos: por un lado la regulación positiva de péptidos anorexigénicos y por otra la regulación negativa de péptidos orexigénicos, con el fin de contribuir a la regulación del peso corporal (Kotsis V et al., 2010).

Por otro lado, en lo que respecta al gasto calórico, la actividad física voluntaria, el metabolismo basal y la termogénesis son sus principales componentes. La termogénesis adaptativa, producida en el tejido adiposo, tras el aumento excesivo en la ingesta dietética, tiene lugar por un desacoplamiento de la cadena de transporte de electrones de la fosforilación del ADP para producir ATP, lo que altera la eficiencia energética de la célula. Este hecho se produce debido a la expresión de la proteína desacoplante mitocondrial UCP-1, situada en la membrana mitocondrial interna. El mecanismo de acción de esta proteína, para la cual los ácidos grasos son indispensables, consiste en catalizar la transferencia de protones desde el espacio intermembranoso hacia la matriz mitocondrial disipando, en forma de calor, el gradiente electroquímico de protones y provocando una disminución de la eficiencia energética de la mitocondria.

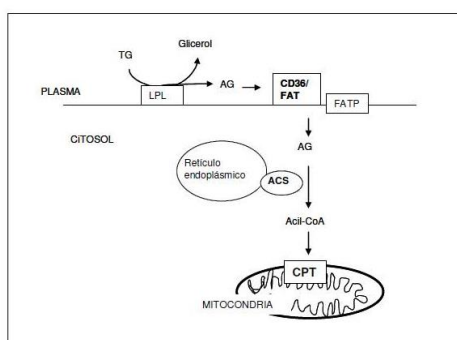


La insulina es un importante modulador del gasto energético. Así como la leptina, esta hormona interactúa con moduladores rápidos de la ingesta modificando su potencia. Una de las muchas hormonas gastrointestinales que tienen efectos en la secreción de la insulina y regulación de la glucosa es el péptido similar al glucagón (GLP-1). Se trata de una hormona conformada por 37 aminoácidos y producida tras la ingesta que se une a su receptor, una proteína de 463 aminoácidos presente en múltiples tejidos, para estimular, entre otras funciones, la secreción de insulina por las células  $\beta$ -pancreáticas. Otras de las respuestas fisiológicas a GLP-1 son la inhibición de la secreción de glucagón y la inhibición del vaciado gástrico, favoreciendo la sensación de saciedad (Adam TC et al., 2005ab). No obstante su vida media es corta (2min) debido a su eliminación por vía renal, vía hepática o por la degradación proteolítica.

#### 4. El metabolismo energético

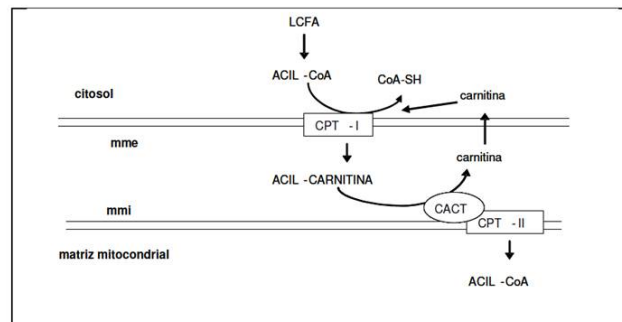
En condiciones normales, aproximadamente el 95% de la energía necesaria para el funcionamiento normal de nuestras células procede de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Stanley WC et al., 2005). Esta energía procede, por un lado de la oxidación de los ácidos grasos (60%), y por otro de la glucosa y del lactato (40%).

Respecto al metabolismo de los ácidos grasos liberados por la acción de la lipoprotein lipasa (LPL) y transportados al citoplasma por proteínas tales como las trasportatas (FAT) o las proteínas de unión a la membrana plasmática (FATP), la acil-CoA sintasa (ACS) se encarga de conjugarlos con el coenzima A dando lugar a los acil-CoA (Figura 12). Estos pueden oxidarse en la mitocondria para producir energía o esterificarse y almacenarse en forma de triglicéridos. En condiciones normales más del 80% de los acil-CoA se oxidan y sólo una pequeña parte se almacena constituyendo un reservorio energético (Eaton S, 2002).



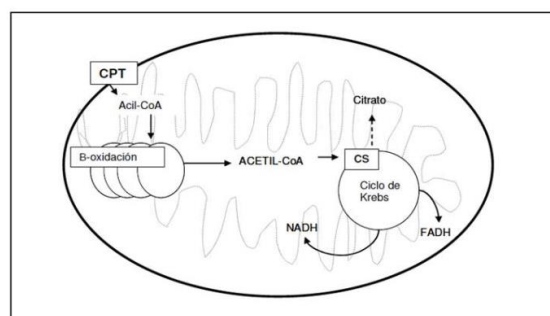
**Figura 12.** Degradación del triglicérido y entrada de los ácidos grasos. (Lopaschuck GD et al., 2007). Triglicérido (TG), lipoprotein-lipasa (LPL), transportadores de ácidos grasos (CD36, FAT, FATP), ácido graso (AG), acil-CoA sintasa (ACS), acil coenzima A (acil-CoA), carnitina-palmitoiltransferasa (CPT).

Los acil-CoA son captados por la mitocondria a través del complejo carnitina palmitoiltransferasa (CPT) formado por carnitina-palmitoiltransferasa-I (CPT-I), carnitina aciltraslocasa (CACT) y carnitina-palmitoiltransferasa-II (CPT-II). CPT-I cataliza la conjugación de los acil-CoA derivados de la carnitina y libera coenzima A al citosol que se reutiliza para activar una nueva molécula de ácido graso. La acil-carnitina es sustrato de CACT que libera carnitina permitiendo que el ácido graso (AG) se vuelva a conjugar con la coenzima A mientras CPT-II lo introduce en la mitocondria (Figura 13).



**Figura 13.** Entrada de los ácidos grasos desde el citosol hasta la mitocondria a través del complejo carnitina-palmitoil transferasa. (Lopaschuck GD et al., 2007). Ácido graso de cadena larga (LCFA), membrana mitocondrial externa (mme), membrana mitocondrial interna (mmi), carnitina-palmitoiltransferasa-I (CPT-I), carnitina aciltraslocasa (CACT), carnitina-palmitoiltransferasa-II (CPT-II).

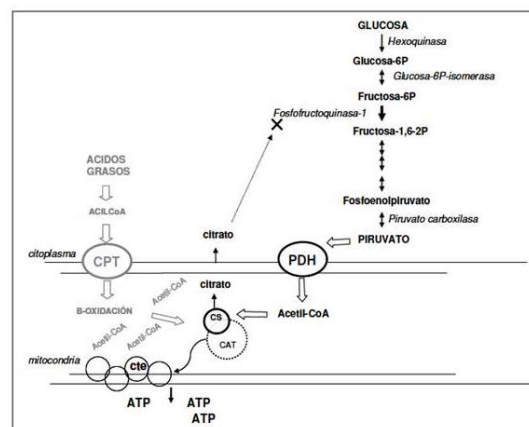
A partir de ese momento en la matriz mitocondrial los acil-CoA se incorporan a la  $\beta$ -oxidación liberando acetil-CoA que posteriormente se transforma en citrato por acción de la enzima citrato sintasa (CS) y se incorpora al ciclo de Krebs para obtener NADH y FADH2 que liberan electrones y generan energía suficiente para la síntesis de ATP (Mitchell P, 1966) (Figura 14).



**Figura 14.** Oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria (Lopaschuck GD et al., 2007).

Respecto al metabolismo de la glucosa, en el citoplasma la glucosa se transforma en glucosa 6-fosfato (6GP) y sigue tres posibles vías: glucólisis, la ruta de las pentosas fosfato y la glucogenogénesis.

La glucólisis es el proceso por el cual la glucosa se transforma en piruvato y se oxida en la mitocondria para obtener energía en forma de ATP. En este proceso el piruvato es susceptible de sufrir oxidación aeróbica o reducirse a lactato, en función de la disponibilidad de oxígeno. Generalmente se lleva a cabo la oxidación aeróbica donde el piruvato se transforma a acetil Coa por la acción de la piruvato deshidrogenasa (PDH), convergiendo así el metabolismo del piruvato con el de los ácidos grasos. Esta ruta está regulada principalmente por la acción de la fosfofructoquinasa (PFK1) y por PDH. La primera enzima transforma la fructosa 6 fosfato en fructosa 1,6 bifosfato. Esta enzima está regulada por la relación ATP/ADP/AMP y por la acumulación citosólica de citrato. Un aumento de ADP y AMP activan la enzima mientras que el ATP o citrato la inhiben. De este modo la  $\beta$ -oxidación puede inhibir la oxidación del piruvato y aumentar la concentración de ATP y citrato (Sudgen MC et al., 1994, Randle PJ., 1998) (Figura 15).



**Figura 15.** Glucólisis e interacción entre la oxidación de los ácidos grasos y el piruvato (Lopaschuck GD et al., 2007).

## 5. Importancia de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal ha sido asociada, por diversos estudios, a funciones como el metabolismo de algunos carbohidratos, la especialización del sistema inmunitario y el control del crecimiento de células del endotelio, especialmente del colon. En este órgano cohabitan más de 7.000 cepas y hasta un total de 800 especies (Berg RD., 1996) que presentan diferencias entre individuos (Nicholson JK et al., 2005). El número de bacterias que se recogen en las heces oscila entre  $6-9 \times 10^{10}$  por gramo (Thiel R et al., 2005) y entre los miles de microorganismos diferentes (Bäckhed F et al., 2005) dominan los grupos *Clostridium coccoides* - *Eubacterium rectale*, *Clostridium leptum*, y Grupo

*Bacteroidetes* (Franks AH et al., 1998, Suau A et al., 1999, Sghir A et al., 2000, Harmsen HJM et al. 2002, Eckburg PB et al., 2005), representando más del 70% .

Además de las señales hormonales y peptídicas que regulan la homeostasis energética, algunas mezclas de microorganismos de la flora intestinal pueden, en cantidades adecuadas, conferir un beneficio en la salud del huésped y favorecer el balance energético. Por un lado, la fermentación microbiana en el colon genera ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y por otro lado la microbiota intestinal consume la energía de los alimentos (Bäckhed F et al., 2005). Los principales ácidos grasos liberados- acetato, propionato y butirato- son absorbidos por diferentes órganos ocupando diferentes destinos metabólicos. Se estima que el epitelio del colon obtiene el 60-70% de su energía del butirato, mientras que el propionato que se transporta hasta el hígado y el acetato es consumido por los músculos (Hooper LV et al., 2002).

La obesidad altera la microbiota intestinal tanto en animales como en humanos (Bäckhed F et al., 2004; Waldram A et al., 2009). Estudios con ratones demostraron que la microbiota intestinal puede regular el almacenamiento de grasa (Bäckhed F et al., 2004 y 2007) y el proyecto Meta HIT demostró que los individuos con mayor presencia de bacterias del género *Bacteroides* (género especializado en los hidratos de carbono) tienen menos problemas de obesidad respecto a aquellos que presentan como género dominante el *Ruminococcus* (especializado en absorber azúcares) pudiendo presentar problemas de sobrepeso (Arumugan M et al., 2011). También, el aumento en la abundancia relativa de *Firmicutes* y las reducciones proporcionales en la abundancia de *Bacteroides* podrían ser el mecanismo que explicaría las diferencias halladas entre obesos y delgados (Raoult D., 2009, Ley RE et al., 2005). En otros estudios sobre la microbiota en modelos animales, se ha establecido relación entre la obesidad y una mayor proporción de *Archaea*. Asimismo se ha detectado una reducción de *Bifidobacterium* y un aumento de *Halomonas* y *Sphingomonas* en la microbiota intestinal de animales genéticamente obesos (*fa/fa*). En lo referente a la microbiota de gemelos obesos y delgados, se ha llevado a cabo un estudio donde se han analizado las heces, detectándose una menor proporción de *Bacteroides* y mayor de *Actinobacterias* en las personas obesas (Turnbaugh PJ et al., 2009).

Varios estudios en animales han demostrado que determinadas alteraciones en la composición de la microbiota intestinal asociadas a la obesidad pueden revertirse mediante la transferencia por vía oral de la microbiota intestinal de individuos delgados (Turnbaugh PJ et al., 2006 y 2008). También la administración de determinados *Lactobacillus* capaces de sintetizar ácido linoleico conjugado (CLA), pueden llegar a modular la fisiología de las células adiposas de modelos animales, cambiando su composición significativamente (BIOCLA., 2011). Estos resultados ponen de manifiesto que la manipulación intencionada de la microbiota intestinal a través de la dieta podría

considerarse una herramienta para prevenir o modificar el riesgo de obesidad. Sin embargo, dichos hallazgos no pueden trasladarse al ser humano, ni puede establecerse una relación causal mediante estudios en modelos celulares y animales (Delzenne N et al., 2009) sino que se requieren muchos estudios clínicos realizados en humanos y hasta la fecha no hay resultados prometedores (Park S et al., 2015). De los nueve estudios clínicos randomizados que recoge la literatura científica (Kadooka Y et al., 2013; Zarrati M et al., 2013; Woodard GA et al., 2009; Agerholm-Larsen L et al., 2000; Gøbel RJ et al., 2012; Sharafedinov KK et al., 2013; Tripolt NJ et al., 2013; Lee SJ et al., 2014; Sánchez M et al., 2014), ninguno ha revelado diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal, en el IMC ni en la grasa visceral respecto al placebo.

## 6. Relación con las enfermedades cardiovasculares

El desarrollo de la obesidad va asociado a la aparición de un número importante de enfermedades, mediadas, muchas de ellas, por una resistencia a la insulina (Bonomini F et al., 2015; Hildreth KL et al., 2012; Steinberger J et al., 2003; Bray GA., 2004). Esto contribuye al posicionamiento del sobrepeso y de la obesidad como quinto factor de riesgo de defunción en el mundo (Segula D., 2014).

La obesidad y la enfermedad cardiovascular son procesos multifactoriales con muchos puentes de unión entre sí (Aranceta J et al., 2003). Muchos de los elementos fisiopatológicos asociados con la obesidad son factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular y hay muchos estudios epidemiológicos y clínicos que así lo han demostrado. La literatura registra, en estudios con familias y gemelos, que existen asociaciones en el genoma de personas con problemas cardiovasculares y personas obesas. Concretamente se han identificado 87 regiones autosómicas (181 polimorfismos de nucleótido simple (SNP)) que mapean 56 genes pleiotrópicos. Muchas de estas regiones pleiotrópicas contienen genes asociados a la enfermedad coronaria y a los lípidos plasmáticos mientras que algunos de ellos son compartidos en los factores de riesgo cardiovasculares y en la obesidad (Rankinen T et al., 2015).

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en el mundo, afectando a 17 millones de personas cada año, incluyendo la enfermedad coronaria, la inflamación, la enfermedad reumática del corazón, el accidente cerebro vascular y la hipertensión (WHO., 2012).

La distribución del tejido adiposo es lo que contribuye a la aparición de los distintos factores de riesgo cardiovascular, siendo la grasa visceral abdominal la que se asocia con alteraciones importantes en el metabolismo de la glucosa y la insulina y con el aumento de la prevalencia de cardiopatía isquémica (Di Chiara T et al., 2012; Matsuzawa Y et al., 2011). Esta relación varía notablemente entre poblaciones (Hiuge-Shimizu A et al., 2012).

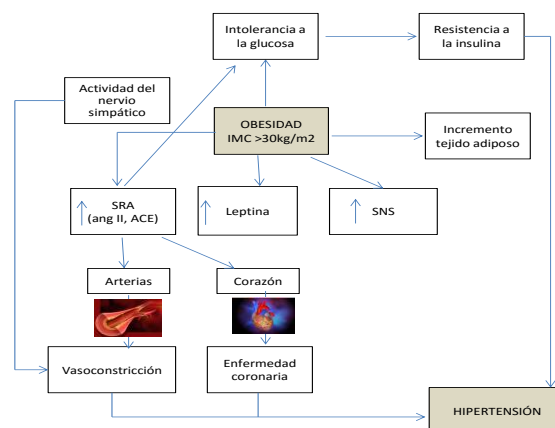
La obesidad relacionada con la hipertensión es un rasgo multifactorial y poligénico (Aghamohammadzadeh R et al., 2012). Cada vez se identifican más locus genéticos y genes que unen la obesidad y la hipertensión (Russo P et al., 2010; Aranceta J et al., 2003) y los factores ambientales tienen una gran repercusión en las posibles modificaciones en la expresión de la información. En el estudio Framingham, la obesidad justifica el 78% y 65% de hipertensión en hombres y mujeres respectivamente (Garrison RJ et al., 1987; Hubert HB et al., 1983). Un incremento del IMC de  $1,7\text{kg/m}^2$  en hombres y  $1,25\text{kg/m}^2$  en mujeres produce una subida de la presión sistólica en 1mm Hg. En un estudio de cohortes llevado a cabo con 82.473 participantes de edad mediana (18 años y mayores), se demostró la relación directa entre el IMC y el riesgo de hipertensión (Huang Z et al., 1998) y la grasa visceral abdominal fue una característica común en ambas enfermedades (Janssen I et al., 2004).

En el desarrollo de la hipertensión ligada a la obesidad intervienen diferentes mecanismos, como el sistema nervioso simpático (SNS) y el sistema renina-angiotensina (SRA). En primer lugar, el aumento de la actividad simpática es una característica presente tanto en los animales obesos (Prior LJ et al., 2010) como en los humanos (Wofford MR et al., 2001). Elevados niveles de leptina e insulina circulante contribuyen a la activación de la actividad simpática renal pero no producen efectos inhibitorios del apetito, termogénesis o pérdida de peso (Rahmouni K et al., 2002). Esta hiperactividad simpática no sólo obedece a la hiperinsulinemia inducida por obesidad, sino también a un efecto directo de la mayor ingesta calórica, por lo que es mayor en individuos obesos sean o no hipertensos (Grassi G et al., 1995; Agapitov A et al., 2001). Por otro lado, la insulina en individuos con normopeso induce vasodilatación en el músculo esquelético. Sin embargo, en obesos hay escasa respuesta del flujo sanguíneo a la insulina, y la acción vasoconstrictora del SNS en vasos de músculo esquelético reduce la absorción de glucosa por el músculo, favoreciendo la resistencia insulínica e hiperinsulinemia (Esler M., 2000 y 2001).

En segundo lugar, el sistema renina-angiotensina (RAS) o sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) es un sistema hormonal que ayuda a regular a largo plazo la presión sanguínea y el volumen extracelular corporal. Durante mucho tiempo se ha establecido que la hiperactividad del RAS desempeña un papel importante en la aparición de la obesidad, enfermedades metabólicas e hipertensión (Weisinger RS et al., 2007). La renina es secretada por las células granulares del aparato yuxtaglomerular y cataliza la conversión del angiotensinógeno (glucoproteína de 452 aminoácidos producido en el hígado, el corazón, los riñones y el tejido adiposo) en angiotensina I que, por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), secretada por las células endoteliales se convierte en angiotensina II, un potente vasoconstrictor que incrementa la resistencia vascular periférica y en consecuencia eleva la presión arterial. Cuando se une a sus receptores, se liberan radicales libres en los vasos sanguíneos que favorecerán la

producción de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno, así como la formación de productos avanzados de glicosilación, lo cual conllevará a la glucotoxicidad de la célula beta con la posterior apoptosis de la misma (Sowers JR., 2002; Matsuoka T., 1997). En este sentido inhibir ECA puede ser terapéuticamente útil para evitar la oxidación celular, reducir la presión sanguínea y la masa grasa corporal. De hecho, varios estudios han demostrado la capacidad de los péptidos bioactivos o inhibidores de la ECA para realizar estas funciones, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Lee SH et al., 2010, Li GH et al., 2007, Mathai ML et al., 2008, Ohta T et al., 1997). Por otra parte, diferentes inhibidores de la ECA, tales como captopril, enalapril y perindopril se utilizan ampliamente como fármacos antihipertensivos, además de para la reducción de la masa grasa corporal (Mathai ML et al., 2008).

De este modo, en relación con el síndrome metabólico, se estima que al menos 50% de los pacientes hipertensos son resistentes a la insulina, y los pacientes con obesidad visceral tienen niveles elevados de todos los componentes del SRA. Se ha demostrado que la dieta hipocalórica y la pérdida de peso es capaz de corregir los niveles séricos y la actividad de la renina plasmática, angiotensinógeno y aldosterona, por lo que se infiere que la dieta hipercalórica juega un papel preponderante en la activación de este sistema (Sarzani R et al., 2008). El adipocito es capaz de generar cada uno de los componentes del SRA, de manera tal que el incremento de la adiposidad visceral conlleva a un aumento en la producción local de angiotensinógeno que está regulada por la alimentación (Harp J et al., 2002) (Figura 16).



**Figura 16.** Mecanismos implicados en hipertensión: resistencia a la insulina (síndrome metabólico) o leptina (obesidad): relación del sistema nervioso simpático (SNS), hiperactividad y la presión arterial.

Consecuentemente la hipertensión arterial así como la dislipemia, asociada a una mayor producción de la síntesis hepática de las partículas VLDL (Pouliot MC et al., 1991) y la intolerancia a la glucosa, son responsables del riesgo coronario, estimado tres veces

superior en aquellas personas con un IMC superior a  $29\text{kg}/\text{m}^2$  con respecto a un IMC inferior a 21 (Bray GA., 2004).

## 7. Costes sociales y económicos

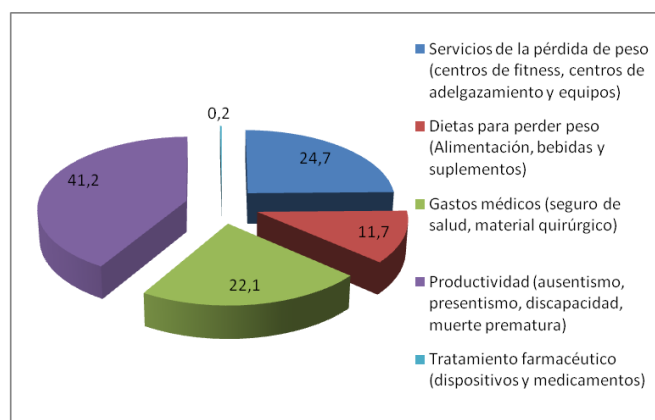
La obesidad no sólo tiene implicaciones en la salud y en el bienestar de las personas (Dixon J., 2010) sino que genera un coste social y económico preocupante (Yach D et al., 2006). Desde este punto de vista, la obesidad tiene un fuerte impacto económico negativo en los presupuestos para la salud, ya que además de reducir la esperanza de vida, es un factor detonante de diversas enfermedades degenerativas que generan grandes costes sanitarios (Landsberg L et al., 2013). El coste económico de la obesidad comprende los costes directos, definidos como aquellos generados en concepto de prevención, diagnósticos, tratamiento y rehabilitación, los costes intangibles, en concepto de enfermedades asociadas al impacto de la obesidad en la salud individual y los costes indirectos, medidos como pérdidas de producción, debido al ausentismo en el trabajo y a la muerte prematura (Finkelstein EA et al., 2010; Hammond RA et al., 2010).

La revisión de la literatura acerca del impacto económico de la obesidad indica que los costes directos en diversos países del mundo representan entre el 2-7% del presupuesto destinado a la salud pública (WHO Plan de acción 2013-2020) y el Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (EUFIC) afirma que el coste humano estimado de la obesidad es de 18 millones de días de baja y de 30.000 muertes cada año en España, lo que se traduce en una pérdida de 40.000 años de vida laboral y una disminución de la esperanza de vida en nueve años. En Estados Unidos, los adultos con sobrepeso y obesidad gastan por año, en cuidados médicos, 340 USD y 1.069 USD respectivamente y se estima que en 2030, el 78,9% de esta población tendrá sobrepeso u obesidad. Esta proyección conllevará a un gasto de 860,7–956,9 mil millones de dólares en 2030, duplicándose los costes asociados a la obesidad cada década (Wang Y et al., 2008; Yang Z et al., 2008), representando 16-18% de los costes totales en USA.

A los costes directos relacionados con la prestación de servicios de salud, deben adicionarse otros elementos indirectos para la sociedad, como la dificultad de las personas a encontrar empleo, la búsqueda de viviendas adecuadas y nuevas oportunidades educativas. De esta manera, al coste económico generado por la prestación de servicios de salud debe agregarse el coste del estigma social, el deterioro psicológico y la discriminación, además de la reducción de la productividad laboral y el aumento de la tasa de absentismo. Todo ello genera unos costes de más del 1% del PIB en Estados Unidos (Sassi F., 2010).



La Figura 17 recapitula el coste total global del sobrepeso y la obesidad que se encuentran repartidos en costes de productividad, servicios, gasto sanitario, alimentos, bebidas y suplementos y fármacos (Cawley J., 2010).



**Figura 17.** El mercado global de la obesidad (%) (Figura de elaboración propia a partir de Markets and Markets 2011 y Markets and Markets 2013 y Hammond., RA *et al.*, 2010; Wang Y *et al.*, 2008).

En España, en un estudio reciente llevado a cabo en Badalona, mostró que los costes asociados a la obesidad habían incrementado un 64,5% desde 2003 a 2009 pasando de un gasto anual por persona obesa en España de 407,44€ en 2003 a 631,39€ en 2009 (repartidos en visitas médicas (~87%) y analíticas (~13%)) (Sicras-Mainar A *et al.*, 2012).

## II. LA ALIMENTACIÓN FUNCIONAL

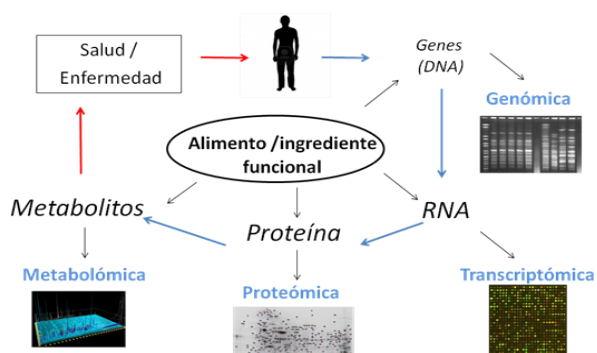
### 1. Generalidades

Las necesidades nutricionales han ido variando a lo largo del tiempo en función de una serie de condicionantes sociales y económicos. Toda la despensa alimentaria con la que contamos a día de hoy es fruto de millones de años de evolución.

Desde la dieta paleolítica pasando por el uso de la agricultura, la ganadería y el cultivo de cereales, los hábitos alimenticios han ido evolucionando notablemente, pese a que el genoma humano no ha sufrido grandes modificaciones (Abuissa H *et al.*, 2005). La primera globalización de la tierra en el siglo XV, dejó de lado la alimentación monocorde, y la Revolución Industrial y el crecimiento tecnológico a finales del siglo XIX, favorecieron la agricultura intensiva y la aparición de los ingenios de máquinas agrícolas. En esta época, se seleccionaron las especies adecuadas para mejorar las cosechas, se desarrollaron métodos de conservación de los alimentos y la nutrición marcó el principio de una nueva era.

A lo largo del siglo XXI la “nutrición adecuada”, entendida como suficiente y capaz de prevenir las carencias, ha ido dejando paso a la “nutrición óptima” siendo aquella que

proporciona beneficios fisiológicos, además de aportar las necesidades energéticas y nutricionales básicas. Esta transición ha traído consigo un cambio en el patrón de enfermedades, despuntando las enfermedades crónicas no trasmisibles (ENT). Dado que la obesidad está estrechamente ligada a la alimentación y a la aparición de numerosas enfermedades metabólicas y neurodegenerativas (Businaro R et al., 2012; Profenno LA et al., 2010; Morley JE et al., 2010), el conocimiento de las bases genéticas y moleculares de los individuos ante una determinada dieta, podrá favorecer un correcto diagnóstico y un tratamiento adecuado. No obstante, teniendo en cuenta las diferencias tan drásticas en las respuestas de cada individuo a una determinada dieta, las recomendaciones generales abren paso al asesoramiento médico dietético preventivo y personalizado. En este sentido, la nutrigenómica es la ciencia que estudia el efecto que producen los nutrientes en la expresión génica de manera individual, analizando, desde la expresión de la información genética que los caracteriza (transcriptoma), su composición en proteínas (proteoma) y las diferentes biomoléculas o metabolitos que los constituyen (metaboloma). Estos hallazgos son el primer eslabón hacia la formulación de dietas personalizadas e inteligentes, diseñadas de acuerdo con las demandas específicas de genotipos individuales y crean nuevas oportunidades a las industrias alimentarias para la selección de nuevos alimentos o ingredientes funcionales (Figura 18) (El Sohaimy SA., 2012).



**Figura 18.** Herramientas utilizadas para validar la funcionalidad de un ingrediente (Figura de elaboración propia a partir de IFT Expert Report).

El término “funcional” fue usado por primera vez en Japón en los años 80 para productos alimenticios enriquecidos con constituyentes que poseen efectos fisiológicos beneficiosos (Hardy G., 2000) y su definición más ampliamente aceptada es la proporcionada por la International Life Science Institute (ILSI., 2002). Este Instituto declara que “un alimento puede considerarse funcional si se demuestra satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de

enfermedad, o ambas cosas.” Este concepto ha llevado a diferentes interpretaciones en los diferentes países del mundo y sus limitaciones varían según la zona geográfica, las diferencias culturales y la situación de cada mercado (Diplock AT et al., 1999; Kwak NS et al., 2001).

Un alimento puede hacerse funcional eliminando componentes perjudiciales presentes en el mismo, incrementando la concentración de un componente presente de forma natural hasta unos niveles en que pueda inducir los beneficios esperados o incrementando la concentración de una sustancia no nutritiva hasta niveles en que se conoce su efecto beneficioso, añadiendo un componente no presente de forma natural en el alimento cuyos efectos beneficiosos son reconocidos, sustituyendo un componente por otro de reconocido efecto beneficioso, incrementando la biodisponibilidad o estabilidad de un componente capaz de producir un efecto funcional o reduciendo un potencial riesgo de enfermedad del propio alimento.

Además de los alimentos funcionales, existe una serie de conceptos muy relacionados con la alimentación funcional descritos por el Codex Alimentarius que son los siguientes:

1. *Productos alimenticios para usos nutricionales especiales*: Son aquellos elaborados o preparados especialmente para satisfacer necesidades especiales de alimentación, determinadas por unas condiciones físicas o fisiológicas particulares y/o por enfermedades o trastornos específicos. La composición de estos alimentos deberá ser, fundamentalmente, diferente de los alimentos ordinarios con los que se comparan, en caso de que dichos alimentos existan (Norma General para el Etiquetado y Declaración de Propiedades de Alimentos pre-envasados para Regímenes Especiales (CODEX STAN 146-1985).
2. *Alimentos dietéticos para usos medicinales especiales*: Son aquellos que se presentan, especialmente, para el control dietético de ciertos pacientes y sólo pueden consumirse bajo control médico. Están destinados a la alimentación exclusiva o parcial de pacientes con una capacidad limitada o disminuida de tomar, digerir, absorber o metabolizar alimentos ordinarios o ciertos nutrientes contenidos en ellos, o que según el diagnóstico médico tienen otras necesidades especiales de nutrientes, cuyo control dietético no puede lograrse simplemente modificando la dieta normal, tomando otros alimentos para usos dietéticos especiales o mediante una combinación de ambos medios (Norma para Etiquetado y la Declaración de Propiedades de los Alimentos para Fines Medicinales Especiales (CODEX STAN 180-1991).
3. *Alimentos dietéticos para usos dietéticos*: Son aquellos productos de elevado contenido nutritivo, en forma líquida o sólida, para consumo de ciertas personas como parte de una dieta equilibrada a fin de obtener una alimentación

complementaria. Estos productos no están destinados a utilizarse para perder peso o como parte de un régimen médico.

4. *Complementos alimenticios*: Comprenden los complementos de vitaminas y minerales en forma de dosis unitarias, tales como cápsulas, tabletas, polvos, soluciones, etc., en los casos en los que las jurisdicciones nacionales regulen estos productos como alimentos (Directrices para Complementos de Vitaminas y Minerales (CAC/GL 55-2005).
5. *Los nutraceuticos*: Engloban tanto los complementos alimenticios como los alimentos funcionales.
6. *Los nuevos alimentos (Novel Foods)*: Son alimentos que no han sido utilizados en una medida importante para el consumo humano en la Unión Europea antes de la entrada en vigor del Reglamento (15 de mayo de 1997).

## 2. Marco regulatorio

En Europa, el abordaje científico de la alimentación funcional tuvo su punto de partida con el proyecto *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) promovido y coordinado por la Sección Europea del International Life Sciences Institute (ILSI) y patrocinado por la Comisión Europea como Acción Concertada dentro del IV Programa Marco de Investigación.

La ciencia de la alimentación funcional se divide en siete áreas (Tabla 5) propuestas y definidas en el proyecto de Acción Concertada, financiado en el V Programa Marco de I+D de la UE y construido en base al trabajo desarrollado en FUFOSE (PASSCLAIM).

**Tabla 5.** Áreas de interés en alimentación funcional.

---

### Áreas temáticas en la ciencia de la alimentación funcional

---

Patología cardiovascular relacionada con la dieta  
Salud ósea y osteoporosis  
Rendimiento y forma física  
Regulación del peso corporal, sensibilidad a la insulina y diabetes  
Cáncer relacionado con la diabetes  
Estado mental y requerimiento psíquico  
Salud gastrointestinal e inmunidad

---

La Legislación Europea no considera a los alimentos funcionales como una categoría específica de alimentos y tampoco existe una legislación para ellos (Stanton C et al., 2005; Coppens P et al., 2006; Niva M., 2007). Sin embargo, el efecto beneficioso de

estos alimentos suele comunicarse a través de declaraciones nutricionales y declaraciones de propiedades saludables que si están reguladas por el Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo (CE) Nº. 1924/2006.

Una declaración alimentaria o alegación es cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio, con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee unas características específicas. Estas afirmaciones se deben basar en uno o varios efectos funcionales de ese alimento que hayan sido demostrados y comprobados con una metodología científicamente validada. De este modo, académicos, científicos y organismos reguladores tratan de encontrar maneras de establecer una base científica que apoye las alegaciones beneficiosas que se asocian a los componentes funcionales o a los alimentos que los contienen.

En Europa, el Reglamento del Parlamento Europeo y sus modificaciones posteriores, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables, pretende asegurar una competencia transparente, promoviendo y protegiendo la innovación. La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), organismo independiente financiado con el presupuesto de la Unión Europea que fue creado en enero de 2002 como fuente de asesoría científica y comunicación sobre riesgos asociados a la cadena alimentaria, es la responsable de dicha actividad. Entre las alegaciones que evalúa la EFSA, existen las referentes al contenido nutricional y las relativas a la salud. Las declaraciones nutricionales, presentadas bajo un listado de acceso público, indican lo que contienen los alimentos mediante el establecimiento de límites de forma cuantitativa. Las declaraciones de salud recogen los efectos que tienen los alimentos o ingredientes directamente en la salud del consumidor. Existen las relativas a las propiedades saludables y las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad. El objetivo de las primeras es demostrar que existe este efecto beneficioso y garantizar que la sustancia objeto de la declaración está presente en el producto en las cantidades necesarias. Las declaraciones sobre reducción del riesgo de enfermedad garantizan que el consumo de un alimento o de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad. Este tipo de alegaciones se rigen bajo los artículos 13.1 (funcionalidad del organismo con evidencias científicas conocidas), 13.5 (nuevas evidencias científicas) y 14 (disminución del riesgo de patologías o dirigidas al sector infantil) siendo los dos primeros asignados a las alegaciones de salud y el artículo 14 a la reducción de riesgo de enfermedad. Entre las 2.723 alegaciones genéricas (Art 13.1) evaluadas por EFSA hasta la fecha, 490 han sido evaluadas positivamente, 501 están caracterizadas insuficientemente y 1.732 han sido rechazadas. Respecto a las 111 alegaciones de los artículos 13.5 y 14 evaluadas por EFSA, 24 han sido valoradas positivamente, 85 han sido rechazadas y dos han resultado ambiguas (AESAN, Arola L). Concretamente, en relación con diferentes sustancias como los ácidos grasos, los

aminoácidos y otros compuestos nitrogenados, dipéptidos y péptidos, enzimas, flavonoides y carotenoides, nucleótidos, poli-sacáridos y oligosacáridos y otras sustancias (coenzima Q10, creatina, condroitina, chitosán, licopeno, taurina, aminoácidos ramificados...), el Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha publicado los resultados obtenidos sobre el análisis de los mismos sobre su posible efecto funcional y su dosis recomendada en base a los criterios de esta agencia (AESAN., 2013).

En USA, la Food and Drug Administration (FDA), creada en 1906, es la autoridad más antigua en materia de regulación, encargada de vigilar y regular los alimentos, los suplementos alimenticios y los productos biológicos con el fin de garantizar la seguridad y calidad de los productos que se consumen dentro del país. Algunos ejemplos de alimentos o ingredientes funcionales con alegación de salud por parte de FDA o EFSA se muestran en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

**Tabla 6.** Ejemplo de alimentos o ingredientes funcionales con alegación de FDA (IFT Expert Report).

<b>Compuesto</b>	<b>Beneficio en la salud</b>
Fibra soluble de avena	Enfermedad cardiovascular
Proteína de soja	Enfermedad cardiovascular
Fitoesteroles	Enfermedad cardiovascular

**Tabla 7.** Ejemplo de alimentos o ingredientes funcionales con alegación de EFSA (Atlantia Food Clinical Trials).

<b>Compuesto</b>	<b>Beneficio en la salud</b>	<b>Alegación concedida</b>
Flavonoides del cacao	Enfermedad cardiovascular (Función endotelial)	Cocoa flavanols help maintain endothelium-dependent vasodilation, which contributes to normal blood flow (EFSA Journal 2012-2014)
Nueces	Enfermedad cardiovascular (Función endotelial)	Walnuts contribute to the improvement of endothelium-dependent vasodilation(EFSA Journal 2011; 9(4): 2074)
Concentrado de tomate	Enfermedad cardiovascular (Agregación plaquetaria)	Tomato concentrate decrease platelet aggregation (EFSA Journal 2010; 8(7): 1689).

### 3. La alimentación funcional en obesidad

#### 3.1. Marco regulatorio

La búsqueda y evaluación de alimentos funcionales para la obesidad deben basarse en el conocimiento de los procesos básicos que constituyen el sistema de control del peso

corporal. Para ello, es necesario identificar un potencial ingrediente capaz de controlar la ingesta de alimentos o aumentar el gasto energético, y sus efectos deben ser demostrados con respuestas biológicas claramente identificadas, diseñando los apropiados biomarcadores y estudiando su biodisponibilidad.

En este sentido, la búsqueda de compuestos o microorganismos capaces de favorecer la liberación de péptidos saciantes, incrementar el gasto energético y/o favorecer el metabolismo de moléculas, tales como la insulina, son posibles estrategias para la selección de nuevos compuestos (Blundell JE et al., 2002; Holt SH et al., 1995; Burns AA et al., 2001; Choudhary M et al., 2012; Miglioranza Scavuzzi B et al., 2015).

Dentro de las guías de EFSA, existe un listado sobre los requerimientos para obtener una alegación de salud en referencia al apetito, el control de peso y la concentración de glucosa en sangre (EFSA Journal 2012), siendo la saciedad y el peso corporal áreas de interés para esta entidad. La EFSA considera que un ingrediente funcional tiene un efecto sobre el apetito si se comprueba que i) aumenta la saciedad o reduce el hambre y por lo tanto se observa una reducción del peso corporal en humanos, ii) los efectos son sostenidos durante el consumo del ingrediente, iii) los marcadores del efecto sobre el apetito que contribuyen a sustanciar la alegación van acompañados de otra prueba experimental.

En lo que respecta al efecto de un ingrediente sobre el peso corporal, este será valorado positivamente si i) reduce la grasa o el peso corporal en sujetos con exceso de grasa corporal usando métodos válidos y precisos (técnicas de imagen tales como DEXA (Dual Energy X-ray absorptiometry), resonancia magnética, (RMI), tomografía computada (CT)), ii) el efecto es sostenido y las condiciones en las que se consigue se especifican y se demuestra dicho efecto después de un tiempo de consumo del ingrediente o alimento, iii) el efecto se demuestra con la población obesa llevando unos hábitos de vida saludables así como con personas obesas que estén bajo tratamiento farmacológico. En estas alegaciones sobre el peso corporal, EFSA distingue entre aquellas que están relacionadas con el mantenimiento del peso después de una pérdida de peso, aquellas que se asocian con una reducción de la grasa abdominal y aquellas que favorecen el mantenimiento de la masa corporal magra.

En referencia a los alimentos reducidos en calorías, de acuerdo al reglamento (CE) Nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, un alimento para el control del peso corporal puede recibir diversas denominaciones tales como “light”, “bajo valor energético”, “sin aporte energético”, “bajo contenido en grasa”, “sin grasa”, “bajo contenido en azúcares”, “sin azúcares” y “sin azúcares añadidos”. Un alimento podrá ser llamado ligero (light) si la reducción del valor energético es, como mínimo, del 30%. La declaración deberá estar acompañada por una indicación de la característica o características que hacen que el alimento sea «light» o «lite» (ligero). La declaración

“bajo valor energético” solo se puede mencionar si el alimento no contiene más de 40kcal (170kJ)/100g en el caso de los sólidos o más de 20kcal (80 kJ)/100mL en el caso de los líquidos.

“Sin aporte energético” podrá declararse un alimento si carece de aporte energético, o si el producto no contiene más de 4kcal (17kJ)/100mL. Para los edulcorantes de mesa se aplicará un límite de 0,4kcal (1,7kJ) por porción, con propiedades edulcorantes equivalentes a 6g de sacarosa. En particular, la normativa establece distinciones entre “bajo contenido de grasa” y “sin grasa”. La primera se aplica si el producto no contiene más de 3g de grasa por 100g en el caso de sólidos o 1,5g por 100mL en el caso de los líquidos. La segunda puede mencionarse si el producto no contiene más de 0,5g de grasa por 100g o 100mL. Con respecto al azúcar, puede hacerse mención de “bajo contenido de azúcares”, “sin azúcares” o “sin azúcares añadidos” si se cumplen los siguientes criterios: la primera, si el producto no contiene más de 5g de azúcares por 100g en el caso de sólidos o 2,5g de azúcares por 100mL en el caso de líquidos; la segunda si el producto no contiene más de 0,5g de azúcares por 100 g o 100mL; y la tercera puede mencionarse si no se ha añadido al producto ningún monosacárido ni disacárido, ni ningún alimento utilizado por sus propiedades edulcorantes. Si los azúcares están naturalmente presentes en los alimentos, en el etiquetado deberá figurar asimismo la indicación: “Contiene azúcares naturalmente presentes”.

### 3.2. Los compuestos funcionales en obesidad

#### *3.2.1. Los macronutrientes*

Cuando el centro del hambre se estimula, aparece la sensación de apetito influenciado por un gran número de factores biológicos y ambientales (Blundell J et al., 1987). Si por el contrario el estímulo llega al centro de la saciedad, se frena el deseo de comer evitando el posible acúmulo de una excesiva carga calórica. La saciedad es un factor muy valorado por la EFSA, impulsando así la selección de nuevos ingredientes funcionales para el control de peso (EFSA Journal 2012). Diversos estudios han demostrado el poder saciante de ciertos alimentos (Kissileff HR et al., 1984; Holt SH et al., 1994, 1995 y 2001; Porrini M et al., 1995; Turconi G et al., 1995; Crovetti R et al., 1997; Guinard JX et al., 1998; Rolls BJ et al., 1998; de Graaf C et al., 2004; Zandstra EH et al., 1999; Green SM et al., 1996; Himaya A et al., 1997; Merrill EP et al., 2002 y 2004; Flint A et al., 2000; Bell EA et al., 2003) así como los diferentes métodos para cuantificar la saciedad (Holt SH et al., 2001; Porrini M et al., 1995; Rolls BJ et al., 1998; Flint A et al., 2000; Guinard JX., 1998; Zandstra EH et al., 1999).

La revisión bibliográfica realizada (Tabla 8) nos permite clasificar diferentes macronutrientes en función de su repercusión sobre la sobreexpresión de moléculas orexogénicas o anorexogénicas (Johntone AM et al., 1996; Prentice AM et al., 1996;



Stubbs RJ et al., 1996; Porrini M et al., 1997; Reid M et al., 1997, Poppitt SD et al., 1998; Marmonier C et al., 2000; Astrup A et al., 2000ab; Bensaid A et al., 2002; Westerterp-Plantenga MS et al., 2004; Anderson GH et al., 2004) destacando el poder de las proteínas en la liberación de compuestos que favorecen el gasto energético y la reducción de la ingesta.

**Tabla 8.** Efecto de diferentes ingredientes sobre el incremento o la reducción de péptidos orexigénicos y anorexigénicos implicados en la obesidad (Tabla de elaboración propia a partir de Salmenkallio-Marttila M, et al., 2009).

Péptido	Carbohidrato	Fibra	Grasa	Proteína
<b>CCK</b>	↑ (Hasegawa H et al., 1996; Bowen J et al., 2006b; Mössner J et al., 1992)	↑ (Heini AF et al., 1998; Bourdon I et al., 1991 y 2001)	↑ (Feltrin KL et al., 2004; y 2007; Pilichiewicz AN et al., 2005)	↑ (Bowen J et al., 2006ab; Blom WAM et al., 2006)
<b>Grelina</b>	↓ (Monteleone P et al., 2003; TannousV dit el Khoury D et al., 2006; Shiiya T et al., 2002)	↓ Nedvickova I et al., 2003; Karhunen L et al., 2005; Erdmann J et al., 2003; Möhlig M et al., 2005) NO EFECTO (Juvonen K et al., 2006; Gruendel S et al., 2006)	↓ (Monteleone P et al., 2003; Greenman Y et al., 2004) NO EFECTO (Möhlig M et al., 2002; Murray M et al., 2006) ↑ (Erdmann J et al., 2004)	↓ (Al-Awar R et al., 2005; Blom WAM et al., 2006; Bowen J et al., 2006ab) NO EFECTO (Greenman Y et al., 2004) ↑ (Erdmann J et al., 2003 y 2006; Groschi M et al., 2003)
<b>GLP-1</b>	↑ (Elliot RM et al., 1993; Herrmann C et al., 1995; Kong MEC et al., 1999)	NO EFECTO (Frost GS et al., 2003) ↑ (Adam TC et al., 2005a) NO EFECTO	↑ Herrmann C et al., 1995; Elliot RM et al., 1993	↑ (Blom WAM et al., 2006; Lejeune MP et al., 2006; Raben A et al., 2003; Hall WL et al., 2003ab)
<b>PYY</b>	↑ (Cox HM et al., 2007)	↑ (Juvonen K et al., 2006) ↑ (Karhunen L et al., 2005)	↑ (Adrian TE et al., 1985; Maas MI et al., 1998)	↑ (Calbet JA et al., 2004; Sangaard KM et al., 2004; Weickert MO et al., 2006; Karhunen L et al., 2005)
<b>Obestatina</b>	↓ (Guo ZF et al., 2007)	---	↓ (mezcla de proteínas, carbohidratos y grasas) (Guo ZF et al., 2007)	↓ (mezcla de proteínas, carbohidratos y grasas) (Guo ZF et al., 2007)
<b>Insulina</b>	↑ (Newgard BC et al., 1995 y 2001; Ullrich IH et al., 1985; Henquin J et al., 2006)	↑ (Jenkins DJ et al., 2000; Besesen DH., 2001; Erkkilä AT et al., 2006)	↑ (depende del tamaño de la cadena y de grados de saturación de los ácidos grasos) (Newgard BC et al., 2001; Stein DT et al., 2006ab)	↑ (depende del origen) (Dangin M et al., 2001; Newgard BC et al., 2001; Copinski B et al., 1967; Palmer J et al., 1975) ↓ (Gannon MC et al., 2002)
<b>Amilina</b>	↑ (Van Hulst KL et al., 1996)	---	NO EFECTO (Poppitt SD et al., 2004)	---

La composición en nutrientes y la densidad energética de los alimentos tienen un papel importante, determinando tanto la saciedad como la frecuencia y tamaño de los episodios de comida. Además de las proteínas, las comidas ricas en hidratos de carbono tienen un elevado índice de saciedad. Diferentes estudios en humanos muestran que un desayuno rico en hidratos de carbono, en comparación con un desayuno rico en grasas, disminuye el apetito durante la mañana y conlleva una menor ingesta en el almuerzo (Blundell JE et al., 2002; Hubert P et al., 1998; Holt SH et al., 1999). La inhibición de la producción de grelina gástrica tras la ingesta de hidratos de carbono puede explicar el efecto saciante de los mismos (Sánchez J et al., 2004). A su vez, los carbohidratos con

bajo índice glucémico participan en la menor segregación de insulina y regulan el apetito (Bran-Miller JC et al., 2002).

Respecto a las grasas, se considera que las comidas ricas en grasas son menos saciantes que las ricas en carbohidratos (Blundell JE et al., 2002). La inducción de saciedad por los componentes grasos de la comida depende de la composición de ácidos grasos y de la tasa de digestión (Weich I et al., 1985) siendo los triacilglicéridos ricos en ácidos grasos de cadena media y los poliinsaturados los que presentan mayor poder saciante (Rolls BJ, et al., 1988; St-Onge MP et al., 2002; Lawton CL et al., 2000). Entre alguno de los ácidos grasos, la literatura científica revela que el Ácido Linoleico Conjugado (CLA) regula el peso corporal en ratas y cerdos inhibiendo la lipoproteína lipasa (LPL), la acetyl-Coa carboxylasa (ACC), la sintasa de ácidos grasos (FAS) y la enzima estearoil-coA desaturasa (SDC), lo que reduce el consumo de lípidos por el adipocito, aunque existe controversia en los resultados (Sisk MB et al., 2001; Clement L et al., 2002; Meadus WJ et al., 2002; Yamasaki M et al., 2003; Zambell KL et al., 2000; Medina EA et al., 2000; Lambert EV et al., 2007; Tholstrup T et al., 2008; Park Y et al., 1997; Blankson H et al., 2000; Kanaya N et al., 2010). Ese compuesto también aumenta la actividad de la enzima Carnitina Palmitoin Transferasa (CPT), presente en el músculo y responsable del transporte de las grasas hacia la mitocondria para ser usada como combustible y reduce la ingesta energética en modelo murino. A nivel de expresión génica, se ha visto una reducción en la expresión de NPY (Cao ZP et al., 2007) cuando se consume CLA y un incremento del gasto energético vía termogénesis y oxidación lipídica en animales. También está implicado en la absorción mitocondrial de ácidos grasos, incrementando la  $\beta$ -oxidación en diferentes modelos murinos, favoreciendo la lipólisis. Diversos estudios han descrito la capacidad del CLA para inhibir la adipogénesis, suprimiendo la diferenciación de los preadipocitos en modelo animal. La conversión de preadipocitos a adipocitos implica la activación de ciertos factores de transcripción como el Proliferador de Peroxisoma Activados de Receptores (PPAR $\gamma$ ), activador de genes lipolíticos cuya expresión se ve disminuida en presencia de CLA tanto en modelo murino como en cultivos celulares (Miner JL et al., 2001; West DB et al., 2000; Terpstra AH et al., 2002; Ohnuki K et al., 2001; Nagao K et al., 2003; Evans M et al., 2000; Miller JR et al., 2008; Brodie AE et al., 1999; Satory DL et al., 1999; Choi Y et al., 2000; Granlund L et al., 2003; Poirier H et al., 2006). Finalmente, Tonalin (producto comercial a base de CLA), reduce la grasa corporal en un modelo sencillo como *C.elegans* (Martorell P et al., 2012) al mismo nivel que el Orlistat.

Respecto a la fibra, el consumo de fibras insolubles como la celulosa y la hemicelulosa han sido ampliamente estudiadas y se ha resaltado su capacidad de ayudar a reducir el valor calórico de las dietas, teniendo un efecto directo en la obesidad y las afecciones diabéticas (Trowell H., 1976). En general, la ingesta de fibra se asocia inversamente al peso y a la grasa corporal (Alfieri MA et al., 1995; Nelson LH et al., 1996) dado que

frenan la ingesta de los alimentos al inducir la producción de CCK y reducir la secreción de grelina en la distensión gástrica. También en el intestino delgado, el tiempo de tránsito del bolo alimenticio, estimula el centro de saciedad del sistema nervioso central y limita la absorción de nutrientes en el tracto intestinal, frenando la acción de las enzimas digestivas. Ciertos tipos de fibra producen un efecto beneficioso sobre el metabolismo lipídico, observándose tras su administración una disminución de la trigliceridemia y de la colesterolemia. También actúan en el metabolismo glucídico y disminuye los requerimientos de insulina tal y como se demostró en un estudio con humanos (Kobayakawa A et al., 2013). Los oligosacáridos no digestibles como los fructanos disminuyen la lipogénesis hepática en ratas no obesas y reducen la esteatosis hepática y el peso corporal en ratas Zucker obesas (Delzenne N et al., 2001).

### *3.2.2. Los péptidos bioactivos*

La saciedad puede ser inducida tanto por proteínas intactas (Ortinou LC et al., 2014), como por los péptidos bioactivos liberados de las mismas tras su digestión o su procesado. Los péptidos bioactivos constituyen secuencias de entre 2 y 20 aminoácidos de peso molecular menor a 6KDa y son capaces de proporcionar un efecto en la salud ejerciendo funciones específicas a nivel local y a nivel sistémico al atravesar el epitelio intestinal y llegar a los tejidos periféricos (Iwaniak A et al., 2007). También los aminoácidos libres pueden ejercer un efecto en la reducción del peso, concretamente el Triptofano, la Fenilalanina y la Tirosina son los más efectivos por su hidrofobicidad o por ser precursores de la serotonina, que regula el apetito creando sensación de saciedad (Hill AJ et al., 1988).

Un estudio llevado a cabo por Mars y colaboradores., (2012) analizó el efecto de determinados alimentos sobre la expresión de los péptidos saciantes CCK, GLP-1 y PYY. En este trabajo se llevaron a cabo estudios de “administración endógena” junto con “estudios de administración exógena” donde se suministraron estos tres péptidos por inyección o infusión y se midió el apetito en diferentes estadios. Se confirmó, tras el análisis de veinte distintos alimentos, que el consumo de alimentos ricos en péptidos bioactivos incrementaba la concentración de CCK. Se midió la sensación de saciedad después de la ingesta y la media, comparado con el grupo control fue de tres veces más alta sobre todo en determinados productos a base de péptidos de soja o leche.

La actividad saciante de los péptidos derivados depende, no sólo de la proteína de origen (Lang V et al., 1998) y de la concentración sino también de las características físicas de la proteína, como son la viscosidad y capacidad de formar geles o solidificar (Solah VA et al., 2010; Uhe AM et al., 1992; Borzoei S et al., 2006; Mikkelsen PB et al., 2000 y 2005; Holt SH et al., 1995, Korhonen H., 2009).

Respecto al origen de la proteína, los péptidos de la soja inhiben la acumulación de grasa en adipocitos 3T3-L1 (Martinez-Villaluenga C et al., 2008) y, en función de su composición, varía la acumulación de lípidos y la expresión de adiponectina. Los péptidos obtenidos por la hidrólisis de la soja con la enzima Alcalase® 2.4 L FG produjeron una reducción en la acumulación de lípidos en los adipocitos de 29% a 46% siendo aquellos hidrolizados con mayor porcentaje de péptidos provenientes de la  $\beta$ -conglycinina los que mayor valor de inhibición mostraron (45,3%), frente a aquellos que presentaban porcentajes más bajos de la  $\beta$ -conglycinina (24,7%). En comparación con otros sustratos, los péptidos obtenidos de la  $\beta$ -conglycinina mostraron un efecto mayor sobre la disminución del colesterol total y de la actividad de la sintasa de ácidos grasos (FAS) que los péptidos provenientes de la caseína y de la glicinina, observado tanto en modelo murino (Tovar-Palacio C et al., 1998; Moriyama T et al., 2004), como en estudios *in vitro* (Martinez-Villaluenga C et al., 2010).

Por su parte, los péptidos de la leche, tienen un destacado efecto saciante (Anderson GH et al., 2004). En concreto, los péptidos del suero lácteo producen saciedad, incrementando los niveles de PYY, CCK y GLP-1 a 28%, 60%, y 65% respectivamente tras su ingesta (Hall WL et al., 2003ab). También aumentan la respuesta a insulina en el plasma y disminuyen la ingesta de alimento en comparación con otras proteínas del atún, huevo o pavo (Pal S et al., 2010). El efecto funcional del suero lácteo puede depender tanto de las proteínas per se, como de los péptidos bioactivos obtenidos tras su hidrólisis (principalmente el glicomacropéptido GMP obtenida de la kappa caseína), por los aminoácidos libres liberados o por una combinación de todos estos componentes. Diversos estudios en ratones y humanos han demostrado que GMP estimula la liberación de CCK (Yvon M et al., 1994) lo que provoca saciedad en ratas (Pedersen NL et al., 2000). En humanos los resultados muestran que no sólo este componente de la leche es responsable del efecto saciante (Gustafson DR et al., 2001). A partir de este último resultado, se estudió en humanos, la combinación de GMP con diferentes mezclas de proteínas del suero lácteo frente a una muestra control a base de carbohidratos en adultos sanos. El grado de saciedad fue mayor para los adultos que tomaron las muestras con proteína en lugar de carbohidratos pero no se observaron grandes diferencias en función de si la muestra llevaba sólo proteína del suero lácteo o proteínas del suero lácteo junto con GMP (Lam SM et al., 2009). También recientemente se ha publicado un listado de péptidos lácteos beneficiosos para las enfermedades del síndrome metabólico ya que reducen el riesgo de obesidad, la aterosclerosis, la hipertensión arterial y la diabetes tipo 2 (Ricci-Cabello I et al., 2012). Finalmente, existen otras fuentes proteicas de las que se han obtenido péptidos funcionales en obesidad como la carne (Lafarga T et al., 2014), los guisantes (Overduin J et al., 2015), el pescado y productos marinos (Manikkam V et al., 2015) y las actividades de los mismos se han evaluado tanto *in vitro* como *in vivo*.

Respecto a la hipertensión relacionada con la obesidad, los péptidos bioactivos provenientes de alimentos tales como las algas (Sato M et al., 2002), el albaricoque (Zhu Z et al., 2010), el trigo (Matsui T et al., 1999), el arroz (Li GH et al., 2007), el ajo (Suetsuna K, 1998), la soja (Lo WMY et al., 2005), el champiñón (Lee DH et al., 2004), el bonito (Fujita H et al., 1995, Yokoyama K et al., 1992), las ostras (Wang J et al., 2008), el huevo (Liu J et al., 2010, Yu Z et al., 2011), la carne (Jang A et al., 2005), el pescado (Fujita H et al., 1999) o la leche (Donkor ON et al., 2007; Nakamura Y et al., 1995) han sido evaluados. Algunos ejemplos de péptidos e hidrolizados con capacidad de inhibir la ECA se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Algunos péptidos e hidrolizados proteicos con capacidad de inhibir ECA.

Autores	Año	Compuesto	Secuencia	IC <sub>50</sub>
Matsui T et al	1993	Hidrolizado con alcalasa musculo sardina	Hidrolizado con alcalasa	240 µg/mL
Pihilanto-Leppasla A et al	2000	Fracciones de purificación de la α-lactoalbúmina y β-lactoglobulina	Trp-Leu-Ala-His-Lys	77 µM¶
			Val-Gly-Ile-Asn-Tyr-Trp-Leu-Ala-His-Lys	327 µM
			Tyr-Gly-Leu	409 µM
			Val-Ala-Gly-Thr-Trp	
			Val-Gly-Ile-Asn-Tyr	534 µg/mL
			Lys-Ala-Leu	
			Val-Phe-Lys	1029 µM
			Leu-Ala-Met-Ala	1062 µM¶
			Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-Ala-Pro-Leu-Arg	635 µM
			Cys-Met-Glu-Asn-Ser-Ala	788 µM
Ala-Leu-Pro-Met-His	521 µM			
Val-Leu-Asp-Thr-Asp-Tyr-Lys	946 µM			
Val-Ala-Gly-Thr-Trp				
Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg	1054 µg/ml			
Sato M	2002	Proteína de alga Wakawa	Fracciones de purificación	13,6 µM
Pedroche J et al	2002	Proteína de garbanzo	Hidrolizado	190 µg/mL
Je JY et al	2004	Proteína de bacalao	Fracciones de purificación	66 µg/mL
				457 µg/mL
				110 µg/mL
				23 µg/mL
13 µg/mL				
Ono S et al	2006	Músculo del salmón	Pro-Pro	13,6 µM
Lee SH et al	2010	Proteína de atún	Gly-Asp-Leu-Gly-Lys-Thr-Thr-Thr-Val-Ser-Asn-Trp-Ser-Pro-Pro-Lys-Try-Lys-Asp-Thr-Pro	11,28 µM
Himaya SWA et al	2012	Gelatina de pescado	Leu-Leu-Met-Leu-Asp-Asn-Asp-Leu	35,7 µM
Chen J et al	2012	Proteína de carpa	Val-Ala-Pro	5,34 µg/mL
Kim SR et al	2012	Péptido de la trucha	Lys-Val-Asn-Gly-Pro-Ala-Met-SerPro-Asn-Ala-Asn	63.9 µM

*Otras funcionalidades asociadas a los péptidos bioactivos*

Además de su capacidad antihipertensiva y antiobesidad, se han descrito secuencias de péptidos bioactivos con actividad reguladora del sistema gastrointestinal, capacidad de mejorar la bioactividad y absorción mineral, así como actividad opioide, anticarcinogénica y antitumoral (Sharma S et al., 2011) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Algunos péptidos bioactivos con actividad funcional (Ricci-Cabello I et al., 2012).

Sistema Fisiológico	Actividad	Secuencia de aminoácidos	Proteína de origen
Sistema cardiovascular	Antihipertensivo	VPP	β-CN
		IPP	β-CN
		RYLGY	α <sub>2</sub> -CN
		AYFYPEL	α <sub>2</sub> -CN
		FFVAPFPEVFGK	α <sub>2</sub> -CN
		LHLPLP	β-CN
		LQKW	β-lactoglobulina
		LF	β-lactoglobulina
		LVPFTGPIP	β-CN
		HLPLP	β-CN
		IAK	κ-CN
		YAKPVA	κ-CN
		WQVLPNAVPAK	κ-CN
		HPHPHLSF	κ-CN
		KKYNVQQL	α <sub>2</sub> -CN
	Antioxidante	PVRYL	α <sub>2</sub> -CN
		YFYPEL	α <sub>2</sub> -CN
		WYSLAMAASDI	β-lactoglobulina
		MHIRL	β-lactoglobulina
	Antitrombótico	YVEEL	β-lactoglobulina
		MAIPPKNQDK	χ-CN
		KNQDK	χ-CN
		NQDK	χ-CN
Hipocolesterémico	AKSCQAQPTTM	κ-CN	
	KRDS	Lactoferrina	
	IIAEK	β-lactoglobulina	
	GLDIQK	β-lactoglobulina	
Opioceo	ALPMH	β-lactoglobulina	
	YPPFGIPNSL	β-casomorquina	
Quelantes de minerales	YPPF	β-CN	
	EASPEVI	χ-CN	
Sistema nervioso	Opioceo	YPPFGIPNSL	β-casomorquina
		YPPF	β-CN
Sistema inmune	Antiestrés	YLGYLEQLLR	α <sub>2</sub> -CN
		YGG	α-lactoalbúmina
	Inmunomodulante	YG	χ-CN y α-lactoalbúmina
		RYLGY	α <sub>2</sub> -CN
		RPKHPKHQGLPQEVLENLLRF	α-CN
		HQKED	α-casomorquina
Sistema óseo	Citomodulante	YPPFGPI	β-casomorquina
		EASPEVI	χ-CN
		RELEELNVPGEVLSSESSEITR	β-CN
Sistema digestivo	Anticarcinogénico	ELEELNVPGEVLSSESSEITR	β-CN
		QMEAESISSEEVVNSVEQK	α <sub>2</sub> -CN
		RPKHPKHQGLPQEVLENLLRF	α-CN
	Antimicrobiano	YGG	α-lactoalbúmina
		YG	χ-CN y α-lactoalbúmina
	Inmunomodulante	RYLGYL	α <sub>2</sub> -CN
		YPPFGIPNSL	β-casomorquina
Opioceo	YPPF	β-CN	

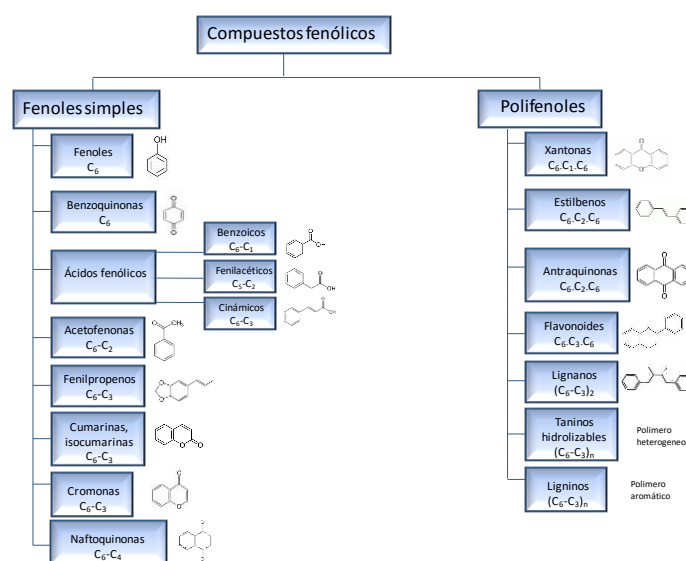
Por otro lado, entre otras aplicaciones de los péptidos bioactivos, ciertos estudios han validado la capacidad antimicrobiana como parte de los mecanismos de defensa conservados a lo largo de la evolución en organismos de muy distinta escala filogenética (Andreu D et al., 1998; Brodgen KA 2005; Brown KL et al., 2006; Hancock REW et al., 2006; Zasloff M 2002) así como su potencial antimicrobiano para el control de microorganismos alterantes del vino (Enrique M et al., 2008 y 2009).

Actualmente en el mercado ya se encuentran productos a base de estos compuestos en forma de complementos nutricionales capaces de producir un efecto saciante (Satiety Pept- Innoves<sup>®</sup>) así como alimentos funcionales tales como Capis<sup>®</sup>, Evolus<sup>®</sup>, Danaten<sup>®</sup>, BioZate<sup>®</sup>, Prodiel F200/Lactium<sup>®</sup>, C12 peptide<sup>®</sup>, Ameal S<sup>®</sup> y Casein DP<sup>®</sup> se contienen algunos de los péptidos antihipertensivos (Korhonen H., 2009).

### 3.2.3. Los polifenoles

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas que poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidróxidos que ejercen una funcionalidad destacada, ampliamente demostrada, en distintos modelos de experimentación.

La naturaleza de los compuestos fenólicos varía, desde moléculas simples como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos, y se pueden agrupar en diferentes clases, dependiendo de su estructura química básica (Figura 19).



**Figura 19.** Clasificación de las familias de compuestos fenólicos.

Los flavonoides constituyen el grupo más importante, dentro de esta clasificación, e incluyen a más de 5.000 compuestos bien identificados. Sus propiedades funcionales son bien conocidas, principalmente por su actividad antioxidante y antihipertensiva.

Respecto a sus propiedades en obesidad, los polifenoles inducen la secreción de péptidos tales como GLP-1 gracias a su capacidad de inhibir *in vitro* la translocación del transportador de glucosa (GLUT2) y la captación de glucosa por los enterocitos. También los polifenoles favorecen la termogénesis en el tejido adiposo marrón,

estimulando la noradrenalina liberada por el sistema nervioso central, y pueden afectar favorablemente la adipogénesis, la lipólisis, el metabolismo de los lípidos y el control del apetito. A nivel del metabolismo de la insulina, hay ciertos polifenoles que actúan sobre la inhibición de la absorción de glucosa como la ploridizina, la naranjinina y la quercitina. Las antocianinas son capaces de normalizar la hipertrofia de los adipocitos en el tejido adiposo blanco epididimal, aminorar la hiperglucemia inducida por dietas altas en grasa y suprimir el desarrollo de la obesidad en ratones (Min SY et al., 2013). Por otro lado, los flavonoles son capaces de actuar en la absorción y en el metabolismo de los lípidos, inhibiendo enzimas lipolíticas y actuando al mismo nivel que el Orlistat (Moreno DA et al., 2003; Slanc P et al., 2009; Birari RB et al., 2007; Gonçalves R et al., 2010). Los polifenoles también previenen la obesidad mediada por una inflamación, así como diferentes enfermedades del síndrome metabólico. Esta capacidad antiinflamatoria se justifica, por un lado, por la capacidad de proteger las células contra el estrés oxidativo, al neutralizar las especies reactivas al oxígeno y al nitrógeno, por reducir la actividad de las enzimas NADPH oxidasa y NOS, por suprimir la cascada de señalización de la inflamación, incluyendo ASK1 y MAPK y por activar los factores de transcripción. Por otro lado, los polifenoles reducen el estrés en la señalización en el retículo endoplasmático bloqueando las citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8 y MCP-1) o endotoxinas mediadoras de kinasas y factores de transcripción.

### 3.3 Métodos de evaluación funcional

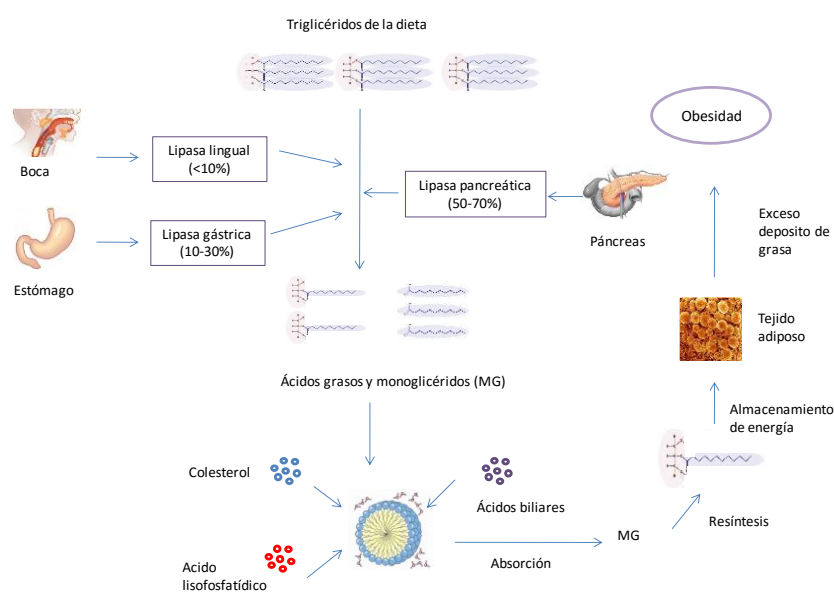
Los compuestos antiobesidad se pueden clasificar en diferentes categorías dependiendo del mecanismo por el que actúan, distinguiendo aquellos que son capaces de disminuir la absorción de lípidos, aquellos con capacidad de estimular el gasto energético, aquellos que presentan capacidad de reducir la ingesta energética, aquellos que inhiben la diferenciación de los adipocitos y los que son capaces de inhibir la lipasa pancreática (LP) (Yun JW., 2010).

#### *3.3.1. Inhibición de la lipasa pancreática (LP)*

Una de las estrategias empleadas para la identificación de nuevos ingredientes funcionales es la búsqueda de compuestos capaces de inhibir la LP. La inhibición de esta enzima favorece la reducción de la ingesta energética a través de mecanismos gastrointestinales que no afectan a mecanismos centrales (Birari RB et al., 2007). Las lipasas o enzimas lipolíticas constituyen el eslabón bioquímico más importante para la regulación hidrolítica de los triglicéridos y, por tanto, su absorción en el intestino. En su forma química original, los triglicéridos no pueden ser absorbidos en el intestino. Por ello, las lipasas cumplen la función de romper los enlaces éster, que unen los ácidos grasos con el glicerol, liberándolos y haciéndolos asimilables. Entre las enzimas hidrolíticas que llevan a cabo esta tarea se encuentran las lipasas preduodenales



(lipasas lingual y gástrica) y las extraduodenales (lipasas pancreáticas, endoteliales y lipoproteín lipasas), siendo la LP la responsable de la hidrólisis del 50-70% de las grasas de la dieta (Mukherjee M *et al.*, 2003) (Figura 20). Se trata de una glicoproteína de 449 aminoácidos con dos unidades de plegado: un dominio catalítico N-terminal y un dominio C-terminal que contiene el sitio de unión colipasa que actúa como un zimógeno ya que la LP necesita esta proteína para completar su actividad (van Tilbeurgh H *et al.*, 1992). El Orlistat actúa a través de este mecanismo de inhibición de la misma y cada vez se buscan más sustitutivos de este fármaco por sus notables efectos secundarios (Chaput JP *et al.*, 2007; (Karamadoukis L *et al.*, 2009; Thurairajah PH *et al.*, 2005).



**Figura 20.** Mecanismo de acción de la lipasa pancreática (Birari R *et al.*, 2007).

Una gran variedad de plantas tienen capacidad de inhibir la LP (Han LK *et al.*, 2005ab; Zhang J *et al.*, 2008; Kishino E *et al.*, 2006; Ono Y *et al.*, 2006) y algunos de los metabolitos secundarios con esta actividad provienen de *Panax japonicus* (Han LK *et al.*, 2005b), *Platycodi radix* (Han LK *et al.*, 2000), *Salacia reticulata*, *Nelumbo nucifera* (Kishino E *et al.*, 2006), (Ono Y *et al.*, 2006). También *Hoodia gordonii* (van Heerden FR., 2007 y 2008) reúne más de 20 patentes internacionales sobre compuestos funcionales derivados de la misma. Esta planta regula el apetito y puede reducir significativamente el consumo de calorías (Lee RA *et al.*, 2007; MacLean DB *et al.*, 2004; van Heerden FR *et al.*, 2007 y 2008). Finalmente extractos de algas marinas (Bitou N *et al.*, 1999) como caulerpenina de *Caulerpa taxifolia* (Tomoda H *et al.*, 2002) también generan inhibición de LP.

Por otro lado, ciertos carbohidratos son capaces de inhibir la LP (Takao I *et al.*, 2006). Concretamente en un modelo animal de experimentación con una dieta alta en grasa que contenía 7-15% de quitina/quitosano, la excreción de grasa en las heces aumentó,

observándose una reducción de peso corporal (Han LK et al., 2005a) manifestada también en ratones *ob/ob* alimentados con oligosacáridos de quitosano (Kumar SG et al., 2009) aunque los efectos de estos hidratos de carbono en humanos no son tan evidentes (Bondiolotti G et al., 2007).

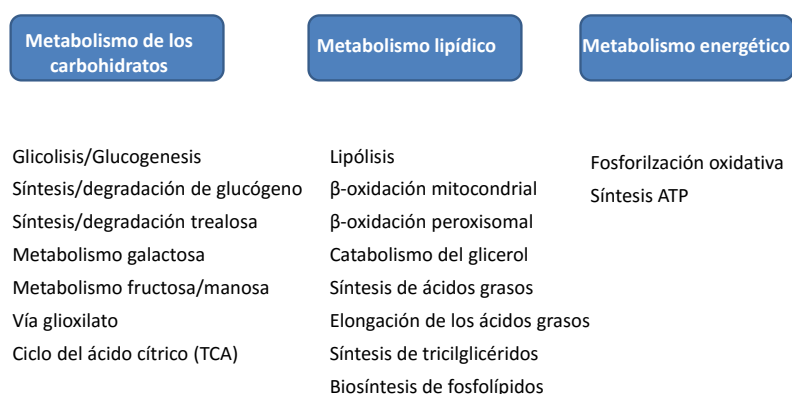
A su vez, metabolitos provenientes de diferentes bacterias tales como lipstatina a partir de *Streptomyces toxytricini* (Weibel EK et al., 1987), panclicinas de *Streptomyces sp.* NR0619 (Mutoh et al., 1994. Yoshinari K et al., 1994), valilactona y ebelactonas de *Streptomyces albolongus* (Kitahara M et al., 1987; Umezawa et al., 1980) tienen fuerte capacidad inhibitoria de la LP así como los micelios de macrohongos (Ahn MY et al., 2007; Slanc P et al., 2004).

Finalmente, los polifenoles del té u otros alimentos presentan inhibición de la LP, destacando, principalmente, la actividad de la catequina y epicatequina (Han LK et al., 1999; Lin JK et al., 2006; Nakai M et al., 2005) así como la de las saponinas, los polifenoles, los flavonoides y la cafeína (Kim HY et al., 2005; Han LK et al., 2006; Moreno DA et al., 2006; Shimoda H et al., 2006).

### 3.3.2. El modelo in vivo de obesidad

En lo que respecta a los métodos de evaluación *in vivo*, los modelos animales constituyen una herramienta muy útil para el estudio de la obesidad. Tradicionalmente se han utilizado roedores en los que la obesidad se debe a una alteración genética. Uno de los más utilizados ha sido el ratón *ob/ob*, que se caracteriza por una deficiencia en la producción de leptina, lo que conduce a una obesidad generalizada. Otro modelo muy utilizado es el ratón *db/db* que se caracteriza por carecer de receptor funcional de leptina, lo cual deriva en hiperleptinemia, obesidad y resistencia a la insulina. No obstante estas modificaciones génicas son poco frecuentes en el hombre, por lo que resultan poco representativas (Boudina S et al., 2007). Una alternativa al uso de estos animales es el uso de modelos de obesidad inducida por dieta, que permiten obtener un fenotipo obeso mediante la administración de una dieta rica en grasas durante un determinado periodo de tiempo. Además del modelo animal, existen modelos sencillos como *C.elegans*, que se utilizan cada vez más para evaluar ingredientes funcionales. Se trata de un organismo de 1mm de longitud que vive en el suelo y se alimenta de *E.coli*, conserva más del 50% de sus genes con los humanos y tiene un ciclo de vida relativamente corto (21 días). Se trata de un modelo ideal tanto para evaluar la capacidad antioxidante de un compuesto (Martorell P et al., 2011), como su actividad antiinflamatoria (Grampone G et al., 2012) y/o antineurodegenerativa (Martorell P et al., 2013). A su vez es un modelo muy utilizado para el estudio de la obesidad dado que el metabolismo de lípidos es una vía muy bien conservada de la levadura a los seres humanos (Chiang SH et al., 2003).

En este modelo, al disponer de la secuencia completa de su genoma, se han podido identificar, por mutagénesis o RNA de interferencia, más de 300 genes relacionados con la reducción de la grasa corporal y 112 genes implicados en el aumento de almacenamiento de grasa, muchos de ellos con homólogos de mamíferos (Ashrafi K et al., 2003; Jia K et al., 2004; Kniazeva M et al., 2003 y 2004; Ludewig AH et al., 2004; Mak HY et al., 2006; McKay RM et al., 2003; Mukhopadhyay A et al., 2005; Taubert S et al., 2006; Vellai T et al., 2003; Watts JL et al., 2002). Las rutas descritas en la Figura 21 se pueden estudiar en este modelo.



**Figura 21.** Listado parcial de las vías metabólicas de *C.elegans* en relación con la obesidad (Ashrafi K., 2007).

## 4. El mercado de los alimentos funcionales: Proceso de desarrollo y lanzamiento de nuevos productos

### 4.1. El papel estratégico del consumidor

Desde el punto de vista empresarial, la innovación y renovación de la cartera de productos es una necesidad primordial. Unas veces las razones son internas a la propia empresa, tales como alcanzar determinados objetivos económico-financieros, encontrar productos de rentabilidad mayor que los actuales u obtener un mejor aprovechamiento de su capacidad productiva o de su red comercial. En otras ocasiones las razones son externas, como el acortamiento del ciclo de vida de los productos, el lanzamiento de nuevos productos por parte de la competencia, las dificultades de aprovisionamiento de ciertas materias primas o el coste de otras. Además, tanto los consumidores, con sus demandas cada vez más exigentes, como la competencia, en su afán por ser más eficaz, son motores permanentes del cambio. Todo lo cual hace que la dirección de las empresas establezcan estrategias y programas que les permitan

identificar las oportunidades de innovación y el desarrollo de estrategias de comercialización de los nuevos productos (Munuera JL et al., 2007).

Las empresas exitosas de hoy que consiguen introducir adecuadamente nuevos productos al mercado, tienen una fuerte orientación al cliente y un fuerte compromiso con el marketing. En el proceso de marketing, es importante crear valor, entendiendo el mercado, las necesidades y los deseos de los clientes, construyendo un programa que entregue un producto diferenciado para finalmente entablar una relación rentable y duradera con los consumidores.

A pesar del enorme avance producido en el desarrollo y mejora de técnicas analíticas y predictivas, la innovación es una actividad arriesgada que provoca desafíos a las empresas, pero no por ello deja de ser una prioridad en las estrategias empresariales para su supervivencia y crecimiento, como se muestra en el informe de la Comisión Europea (Innobarometer 2014), en el que se indica que del 79% de las empresas que han introducido, al menos, una innovación desde 2011, han experimentado un aumento en su cifra de ventas en más de un 25%. Un informe sobre “Best New Product Practice” en empresas del Reino Unido muestra, entre un amplio rango de sectores industriales, que el número medio de nuevos productos introducidos en los cinco años previos fue de veintidós, representando en promedio el 36% de las ventas y el 37% de los beneficios (Tzokas N., 2000).

Es por ello que las empresas deben estar interesadas en trabajar en programas de desarrollo de nuevos productos y proporcionar un entorno innovador para sentar las bases del éxito de los mismos.

En un reciente trabajo Barczak G y colaboradores (2012), a través de entrevistas a directivos de empresa, académicos y expertos en el desarrollo de nuevos productos, identificaron las mejores prácticas en el desarrollo de nuevos productos y las agruparon en siete dimensiones: Estrategia, Investigación, Comercialización, Proceso, Clima del proyecto, Cultura de la empresa, Métricas y Medición del Rendimiento, que definieron como se indica a continuación:

- *Estrategia*: Definición y planificación de una visión y un enfoque de la investigación y el desarrollo (I +D), la gestión de la tecnología, y los esfuerzos de desarrollo del producto en los diferentes niveles del proyecto ya sea a nivel individual y/o a nivel de línea de producto, de división o unidad de negocio, incluyendo la identificación, priorización, selección y apoyo de recursos de los proyectos preferidos.
- *Investigación*: Aplicación de metodologías y técnicas (focus groups, encuestas electrónicas, estudios etnográficos) para detectar, estudiar y comprender a los clientes, competidores y fuerzas del macroentorno del mercado; investigación que

representa la capacidad de la empresa para recoger y utilizar información para impulsar la innovación a través de proyectos de desarrollo de nuevos productos.

- *Comercialización*: Actividades relacionadas con la gestión del marketing, lanzamiento y post-lanzamiento de nuevos productos para estimular la adopción de los mismos por parte del cliente y su difusión en el mercado.

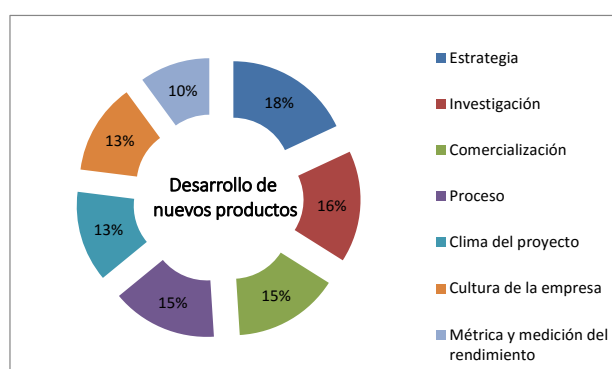
- *Proceso*: Ejecución de las etapas del desarrollo de nuevos productos que van desde el concepto al lanzamiento del producto, junto con las actividades y sistemas que facilitan la gestión del conocimiento a través de los proyectos y de la empresa en su conjunto.

- *Clima del proyecto*: Medios y formas que subyacen y establecen la integración a nivel individual y de equipo dentro de la empresa, incluyendo el liderazgo, la motivación, la gestión y la estructuración de los recursos humanos a nivel individual y de equipo.

- *Cultura de la empresa*: Sistema de valores de gestión de la empresa que conducen esos medios y formas que subyacen y establecen el pensamiento del desarrollo de productos y la colaboración en el desarrollo de productos con socios externos, incluyendo clientes y proveedores.

- *Métricas y medición del rendimiento*: Medición, seguimiento y notificación del rendimiento del programa de desarrollo del producto y del proyecto de desarrollo del producto.

En la Figura 22 se representan los porcentajes que corresponden a cada una de las dimensiones, validadas por dichos autores a través de la metodología Delphi aplicada a 20 académicos y líderes de opinión en la disciplina del desarrollo de nuevos productos, además de entrevistar a 317 directivos y profesionales en el desarrollo de nuevos productos de Estados Unidos, Reino Unido, e Irlanda, con una media de 10 años de experiencia en el desarrollo de nuevos productos.



**Figura 22.** Importancia relativa de las dimensiones de desarrollo de nuevos productos (Barczak G et al., 2012).

Barczak G y colaboradores (2012) clasifican, para cada una de las siete dimensiones, tanto las buenas como las malas prácticas en el desarrollo de nuevos productos en base a los elementos identificados para cada una de las dimensiones. Para el objeto de esta tesis cabe destacar el resultado referido a las buenas y malas prácticas relacionadas con la dimensión Investigación, que se resumen en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Buenas y malas prácticas de investigación en el desarrollo de nuevos productos (Tabla de elaboración propia a partir de Barczak G et al., 2012) .

INVESTIGACIÓN	
Malas Prácticas	Buenas Prácticas
El cliente/usuario no está implicado en el proceso de desarrollo de nuevos productos.	El concepto, el producto y la prueba de mercado se llevan a cabo de manera consistente y vinculada con todos los proyectos de desarrollo de nuevos productos.
Ningún estudio de mercado se lleva a cabo para comprender el mercado.	El cliente/usuario es parte integrante del desarrollo de nuevos productos.
No se lleva a cabo ninguna evaluación real de los resultados de los test de concepto, producto, mercado.	Los resultados de los test de concepto, de producto y de mercado son evaluados formalmente.

Así pues, dichos autores concluyen que las empresas con buenas prácticas en Investigación, proporcionan los recursos necesarios para apoyar la función de investigación y reúnen una variedad de información del mercado para aprender las necesidades, problemas y beneficios actuales; la reacción del cliente al producto propuesto y la sensibilidad al precio; el tamaño del mercado potencial; los ingresos por ventas esperados y la situación competitiva (Cooper RJ et al., 2002).

Así mismo, las malas prácticas en la dimensión Investigación incluyen la realización de una investigación del mercado incompleta, no implicar al cliente/usuario en el proceso y no realizar ninguna evaluación de los resultados técnicos o de mercado.

Entre las actividades relacionados con la ventaja del producto para alcanzar el éxito, Hart S (2003) señala la calidad del producto en comparación a los productos de la competencia, el valor superior percibido por el consumidor, la capacidad de detectar las necesidades de los clientes, la inclusión de los beneficios percibidos por los clientes como útiles y los atributos únicos o exclusivos del nuevo producto.

Todos estos aspectos mencionados justifican que las empresas, en el proceso de desarrollo de un nuevo producto, consideren la necesidad de obtener información previa del mercado a través de una investigación. Para ello se utilizan una gran variedad

de técnicas para medir y determinar el comportamiento del consumidor y sus preferencias en base a planes de muestreo y diferentes tipos de análisis. Generalmente, la investigación suele comenzar con la recopilación de datos secundarios recogidos mediante motores de búsqueda por internet y se completa con datos primarios que incluyen observaciones, encuestas y experimentación. Uno de los métodos empleados para recopilar toda esta información son los métodos cualitativos que implican una comunicación oral libre, directa y espontánea entre personas, mediante la cual se obtiene información de algún tema concreto. Generalmente estos métodos se utilizan para explorar situaciones preliminares de la investigación y son técnicas muy útiles para conocer actitudes, emociones y motivaciones de los consumidores a partir de un grupo pequeño de personas. Algunos ejemplos de estudios cualitativos son los focus group, observación directa o filmada o entrevistas.

Otro tipo de métodos empleados son los métodos cuantitativos que recopilan información descriptiva sobre los hábitos de consumo de una población y sus preferencias sobre la intención de compra. Estos métodos utilizan encuestas o cuestionarios diseñados en función del objetivo que se persigue. En ellos, las preguntas se valoran mediante escalas y posteriormente los datos se tratan mediante análisis estadísticos. Las pruebas cuantitativas permiten evaluar aspectos, no solo en relación con el agrado de un determinado producto, sino también características sociodemográficas, usos, valores, rasgos de personalidad, frecuencias de consumo y grados de satisfacción, siendo la investigación por encuestas el método más utilizado. La primera de las ventajas que presentan las encuestas es su flexibilidad ya que se puede obtener mucha información en situaciones diferentes y la segunda la versatilidad por poder emplearse en cualquier contexto (Aaker D et al., 1989; Chambers E et al., 1991). Las encuestas pueden realizarse por teléfono o por correo, en persona o a través de la web. Actualmente la investigación de marketing online es una de las herramientas más empleadas ya que ofrece muchas ventajas sobre otros métodos tradicionales (Dillman DA et al., 2014). Los investigadores pueden distribuir rápida y fácilmente las encuestas por Internet a miles de encuestados de manera simultánea, a través del correo electrónico o mediante la publicación en sitios web seleccionados.

A continuación el investigador pone en acción el plan de investigación de marketing donde se recopila, procesa y analiza la información. Se deben comprobar los datos respecto a su precisión e integridad y codificarlos para su análisis. En este sentido, se tabulan los resultados y se calculan medias estadísticas. La investigación finaliza cuando se interpretan los hallazgos y se sacan conclusiones. Estos resultados mejorarán las decisiones de marketing que permitirán tomar decisiones más acertadas en futuros trabajos desarrollos de investigación.

#### 4.2. Motivos de éxito y fracaso en la introducción de nuevos alimentos funcionales

El primer paso para garantizar el éxito de un alimento es garantizar la aceptación por parte del consumidor (Siro I et al., 2008). Recientemente, diversos estudios se han llevado a cabo para evaluar los parámetros más importantes para él (Ares G et al., 2007; Childs NM., 1997; Grunert KG et al., 2000; Verbeke W., 2005; Weststrate JA et al., 2002; Gilbert L., 2000; IFIC., 2000; Wrick KL., 1995; Hilliam M., 1996; Poulsen JB., 1999; Niva M., 2000 y 2007; Anttolainen M et al., 2001; Bech-Larsen T et al., 2001; Mäkelä J et al., 2002; Van Kleef E et al., 2002 y 2005). La ciencia del consumidor de alimentos va más allá de las características intrínsecas del alimento (sabor, olor, apariencia, textura...) ya que trata de conocer la percepción que los consumidores tienen sobre el producto (envase, información nutricional, ingredientes, aditivos, precio, marca...) y predecir el comportamiento de estos (momento de consumo, elección...) (Piggott J., 1995; Tuorila H et al., 2002) (Figura 23).



**Figura 23.** Modelo de comportamiento hacia el producto y efecto de las expectativas del consumidor hacia la aceptación del mismo (Figura de elaboración propia a partir de Cardello A., 1996; Deliza R et al., 1996).

Para garantizar el éxito de un producto, el consumidor debe aceptarlo y por ello valorar favorablemente tanto los factores sensoriales como los no-sensoriales. Ciertos parámetros extrínsecos del producto (precio, envase, marca, etiquetado, declaraciones de salud, ingredientes) son claves para la aceptación por el consumidor y crearán las expectativas iniciales que están relacionadas con la satisfacción o insatisfacción (Shepherd R et al., 1991; Rowan C., 2000).

Si se alcanzan las expectativas se producirá una elección y posteriormente una prueba del producto, momento en el que las características sensoriales y funcionales desempeñan un papel fundamental para que las expectativas se superen y el producto vuelva a ser consumido (Deliza R et al., 1996).



Existen varios motivos que pueden explicar por qué los nuevos productos fracasan. Entre ellos, la sobreestimación del tamaño de mercado, el mal diseño de los productos, el posicionamiento incorrecto, el lanzamiento en el momento equivocado, el precio excesivo, la mala publicidad, la falta de evidencias suficientes derivadas de la investigación de marketing o la falta de aporte de valor a los clientes (McMath R et al., 1999, Cholo B., 2005). Pero ante todo, lo importante es detectar que realmente existe esa necesidad y demanda del mercado, por lo que las fuentes más importantes de las ideas de los nuevos productos son los propios clientes.

Respecto a los alimentos funcionales, el primer factor y el más importante para garantizar el éxito de los mismos es la capacidad de desarrollar y comercializar un producto alimenticio de calidad y con un valor añadido respecto a la competencia, que es cada vez mayor (Menrad K., 2003). Esta es la razón por la cual las empresas farmacéuticas en general no están logrando ganar presencia en el mercado de los alimentos funcionales (Menrad K., 2003; Van Kleef E et al., 2002). En concreto, la falta de competencias en la optimización de las propiedades sensoriales de los alimentos, la falta de poder de negociación en la obtención de la distribución minorista de los productos, y la falta de experiencia con precios atractivos y envasado de alimentos se han hecho responsables de la falta de lanzamiento de determinados productos (Menrad K., 2003).

El segundo factor se refiere al posicionamiento de los productos. Es importante segmentar el mercado y evaluar el atractivo y las oportunidades de cada segmento creando una diferenciación y un posicionamiento adecuado. La segmentación puede hacerse de manera geográfica (naciones, regiones, estados, municipios...), psicográfica (clase social, estilo de vida, personalidad...), conductual (ocasiones, beneficios, estatus de usuario, tasa de utilización...) y dentro de los posibles mercados hay que seleccionar los "mercados meta" que son aquellos conjuntos de compradores que comparten necesidades y características comunes que la empresa decide atender. Para ello se debe examinar los principales factores estructurales que afecten al atractivo del segmento a largo plazo y utilizar la estrategia de marketing adecuada (Porter M., 1985; Sawka K et al., 2003). En este sentido se puede utilizar una estrategia de marketing indiferenciado (ignorando las diferencias de segmento y dirigiéndose a todo el mercado con una oferta), marketing diferenciado (diseñando diferentes ofertas para cada uno de los diferentes mercados), marketing concentrado (atendiendo unos segmentos de nicho adquiriendo una fuerte posición de mercado debido a un mayor conocimiento de las necesidades del consumidor). Los análisis de los últimos lanzamientos de alimentos funcionales sugieren que sólo los productos con suficiente atractivo para el mercado masivo lograron sobrevivir y fueron aquellos cuyas comunicaciones crearon una imagen de salud integral, como Actimel de Danone, a menudo en un encuadre positivo como la promoción del bienestar general y la prolongación de la juventud. Los productos con

indicaciones funcionales o de salud muy específicos, apelando sólo a pequeños nichos de mercado, tienden a fallar, sobre todo cuando las comunicaciones utilizan un encuadre negativo o demasiado científico, como la prevención de enfermedades específicas. Sin embargo, la investigación cualitativa demuestra que los consumidores no suelen tener los conocimientos básicos necesarios para evaluar los reclamos funcionales específicos y relacionarlos con su salud personal, a menos que una persona muy cercana a ellos los asesore (Verbeke W., 2005). También es importante considerar que el desarrollo del mercado está muy influenciado por el grado de familiaridad y aceptación de este tipo de alimentos. En este sentido, teniendo en cuenta diferentes encuestas llevadas a cabo en diferentes Países Europeos, los consumidores no están todavía familiarizados con el término “alimento funcional” y son bastante escépticos con los nuevos productos y tecnologías (Bech-Larsen T et al., 2003, Lusk JL 2004 y 2005). Concretamente en Inglaterra, Francia y Alemania el 75% de los consumidores no conocen esta terminología pero el 50% están a favor de enriquecer ciertos alimentos con algún ingrediente beneficioso (Hilliam M., 1999). Por el contrario en Bélgica, el 49% de los consumidores están familiarizados con este término mientras que en Polonia y en Hungría solo el 4% y el 30% los conocen respectivamente (Krygier K., 2007, Szakaly Z et al., 2004).

El tercer factor en el éxito del producto o el fracaso, ha sido el uso de estrategias de medios creativos y alternativos para superar la legislación existente en algunos países de la UE referente a las declaraciones de propiedades saludables, como es el caso de Dinamarca y Suecia (Roberfroid MB 2000 ab). De ahí que los exitosos lanzamientos de determinados productos alimenticios han estado fuertemente influenciados por una combinación estratégica de publicidad y comunicación adecuada. Es por ello que es muy importante que los beneficios del producto queden bien entendidos por el consumidor (Leathwood PD et al., 2007) y que la información se transmita con atributos positivos (Wansink B et al., 2005). En este sentido educar al consumidor es una tarea fundamental por parte de la industria ya que, a diferencia del sabor de otras características sensoriales, los consumidores no pueden percibir directamente el beneficio del producto cuando se trata de un alimento funcional, si no reciben información externa (Peng Y et al., 2006; Urala N et al., 2004).

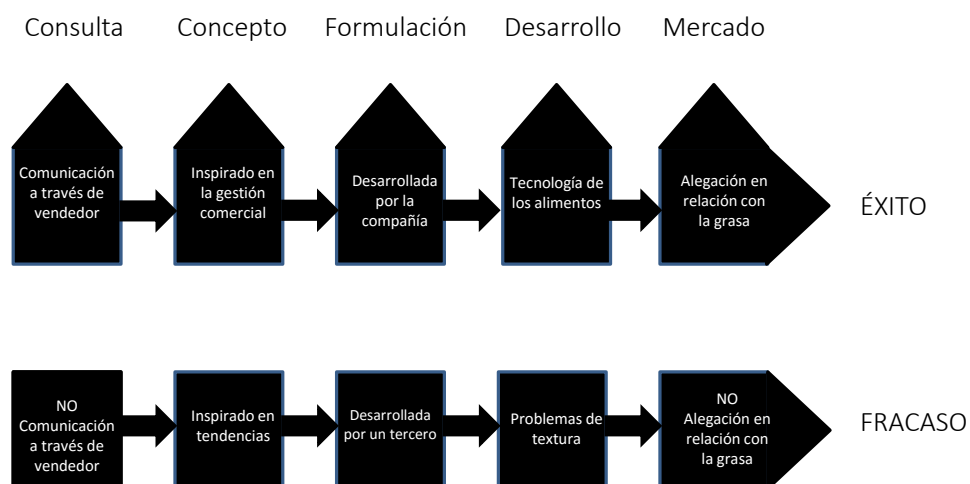
Finalmente en la aceptación por parte del consumidor de los alimentos funcionales y su posterior éxito en el mercado hay que considerar todos los aspectos relacionados con las características sensoriales del producto. En este sentido, parámetros tales como el sabor (Bech-Larsen T et al., 2001; Grunert KG et al., 2000; Urala N et al., 2003; Childs NM., 1997; Gilbert L., 2000; Poulsen JB., 1999; Tuorila H et al., 2002), el formato (van Kleef E et al., 2005), la matriz utilizada como soporte para la formulación del alimento funcional (Bech-Larsen T et al., 2001; Jonas MS et al., 1998; Poulsen JB., 1999; van Kleef E et al., 2005), el etiquetado (Shine A et al., 1997) y el proceso de manipulación del

producto (Balderjahn I., 1988, Grunert KG., 1995; Roberts JA et al., 1997) van a influir directamente sobre la decisión final de consumo. También la biodisponibilidad y el potencial cambio durante el proceso y formulación del alimento y el hecho de disponer de información sobre el ingrediente funcional utilizado, va a afectar notablemente (Kotilainen L et al., 2006; Bech-Larsen T et al., 2003 y 2007; Urala N et al., 2007).

#### 4.3. Comprensión del comportamiento de compra del consumidor en productos para la obesidad

El comportamiento del consumidor a la hora de seleccionar un producto para el control del peso corporal consta de cinco etapas; 1) reconocimiento de la necesidad, 2) búsqueda de información, 3) evaluación de alternativas, 3) decisión de compra y 4) comportamiento postcompra.

La decisión de compra está influenciada por factores culturales, sociales, personales y psicológicos y los factores que garantizan el éxito o fracaso de los productos va a depender de cómo reciban la información (consulta), de cómo esté diseñado el concepto, de cómo esté formulado el producto, de cómo se haya llevado a cabo el desarrollo del alimento y de cómo se haya introducido el producto en el mercado (Figura 24).



**Figura 24.** Modelo de buenas prácticas para productos de control de peso (Stewart-Knox B et al., 2003).

En relación a los productos de control de peso, el consumidor parece aceptar los productos saciantes, tal y como registra la literatura y el creciente mercado de este tipo de productos (Hetherington MM et al., 2013; Bilman EM et al., 2012). Existe en Europa un extenso debate sobre lo que constituye una alegación en saciedad (Blundell J., 2010) y todas las alegaciones presentadas hasta la fecha a la EFSA han sido rechazadas por falta de sustento científico, aunque hay datos rigurosos que defienden que una

estrategia exitosa para el futuro de los alimentos pasa por la identificación de algún compuesto con tal efecto (Halford JCG et al., 2012).

Según diferentes estudios realizados, el potencial saciante de un producto, además de por el efecto metabólico de sus nutrientes, también tiene que ver con otros factores como el etiquetado (Blundell J et al., 1987) o la textura (Davidson TL et al., 2005). El hecho de que un alimento sea más viscoso incrementa la percepción relacionada con la saciedad ya que requiere de masticación y este proceso genera una respuesta del sistema nervioso central y favorece la liberación de péptidos saciantes (Katsuragi I et al., 1994). El papel que ejerce la textura de un alimento en la saciedad, se evidencia con el efecto diferenciado que aportan las calorías de los alimentos líquidos y los sólidos. Un estudio reciente (Almirón-Roig E et al., 2013) demostró que los alimentos líquidos (como zumos) recompensaban más débilmente la recuperación energética de los individuos tras la última ingesta que los alimentos semi sólidos como los yogures o los alimentos sólidos como el pan. Estos hechos fueron contrastados con datos epidemiológicos donde se demostró la relación del consumo de alimentos líquidos y el incremento de peso corporal (Malik VS et al., 2006; Vartanian LR et al., 2007). El efecto de la forma del alimento también se demostró llevando a cabo pruebas de laboratorio manipulando la viscosidad de ciertos productos (Di Meglio DP et al., 2000; Russell K et al., 2004; Tsuchitya A et al., 2006). Se demostró que incrementando la viscosidad de un chocolate semi sólido se aumentaba el tiempo entre comidas, se modificaba la respuesta gástrica y se incrementaba la saciedad (Zhu Y et al., 2013). Concretamente, diversos estudios demostraron que el uso de ciertas fibras que modifican la viscosidad de algunos alimentos, suprimen el apetito (Juvonen K et al., 2009; Vuksan V et al., 2009). Un estudio comparativo del consumo de cuatro tipos de gelatinas diferentes demostró que en forma sólida la sensación de llenado y la liberación de insulina y GLP-1 se incrementó (Cassady BA et al., 2012) y que la transformación del alimento una vez ingerido puede producir cambios en las percepciones de los nutrientes y tener un impacto positivo en la sensación de saciedad. En este estudio, la transformación del alimento en gel en el estómago fue suficiente para alterar la respuesta a la saciedad. Diversos autores y universidades han estudiado modelos integrativos de saciedad y han evaluado la combinación de productos más finos y menos cremosos para incrementar esta sensación (Forde CG et al., 2013; Hogenkamp PS et al., 2011 y 2012). En un estudio llevado a cabo por Yeomans MR (2011) se formularon varios productos con alta capacidad saciante por su elevado contenido proteico a base de diferentes nutrientes para incrementar su poder calórico y con diferentes texturas (cremoso y fino). Se demostró que el grado en el que una bebida suprime el apetito depende de sus características sensoriales. Cuando se mejora sensorialmente el producto (más fino y cremoso), los participantes demostraron que tenían mayor apetito. Un estudio demostró que enriquecer un alimento rico en carbohidratos con proteína produce más saciedad que un alimento proteico per se, comprobándose que la manipulación del

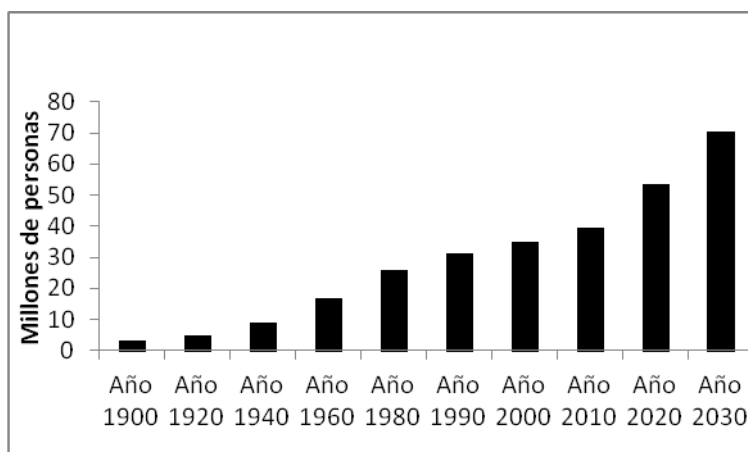
alimento también va asociada a un mayor grado de saciedad (Hogenkamp PS et al., 2013).

Otro aspecto importante que tiene una repercusión directa sobre la saciedad es el etiquetado del producto ya que puede contener información nutricional que produzca en el consumidor este efecto saciante. Crum AJ y colaboradores (2011) demostraron que el consumo de un batido con 620 calorías produjo una notable disminución de la grelina respecto a un batido en cuyo etiquetado se indicaba 120 calorías. A su vez, se observó una activación de las áreas del cerebro implicadas en la regulación del apetito en función de si en la bebida estaba etiquetada como “alimento tratado” o “alimento saludable” (Veldhuizen MG et al., 2013).

Finalmente algunos estudios han demostrado que el tamaño y la percepción visual de un alimento pueden producir una sensación de saciedad significativa (Scheibehenne B et al., 2010). Tanto el volumen de un alimento (Brunstrom JM et al., 2011) como su peso (Piqueras-Fizman B et al., 2012) pueden llegar a producir un efecto saciante mayor que su propio contenido energético.

#### 4.4. Análisis del mercado de los productos actuales

El envejecimiento de la población (Figura 25) y el aumento de la mortalidad asociada a las enfermedades crónicas no transmisibles y relacionadas con la obesidad, favorece su tratamiento tanto a nivel farmacológico como a nivel preventivo.



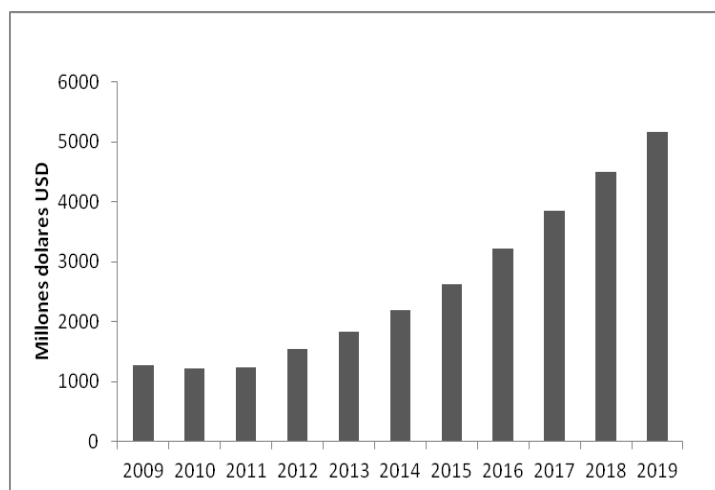
**Figura 25.** Incremento esperado de población mayor de 65 años en Estados Unidos (AOA., 2002).

##### *4.4.1. Productos para el tratamiento farmacológico*

En el mercado farmacéutico, la terapia con medicamentos agrupa un número elevado de supresores del apetito, compuestos que modulan el metabolismo de los

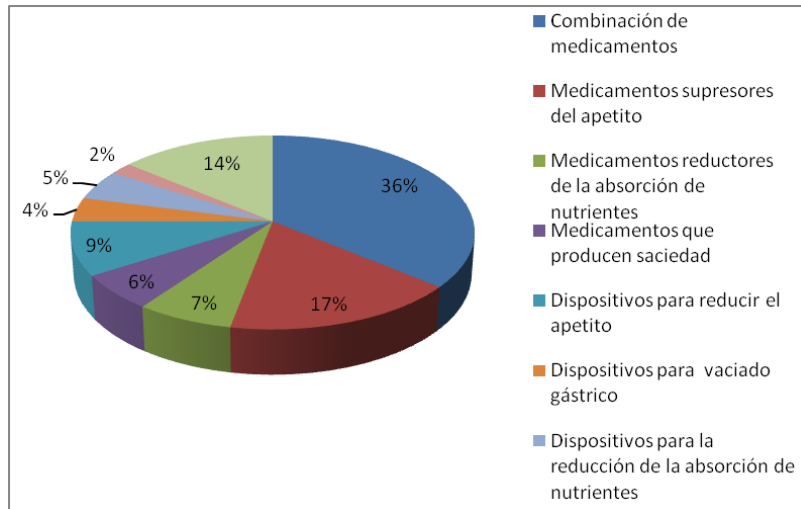
carbohidratos, la oxidación de las grasas o la estimulación del gasto calórico. Entre ellos se incluyen las metforminas, los inhibidores agonistas de GLP-1, las glitazonas, los fibratos, el Orlistat y las estatinas. Muchos de estos compuestos se utilizan también para tratar otras complicaciones relacionadas con la obesidad como es el caso de las metforminas e inhibidores agonistas de GLP-1 utilizados también para diabetes tipo 2, las glitazonas que tienen un efecto directo en la insulina al reducir los niveles de glucosa en sangre, o las estatinas que actúan sobre el colesterol. Estos fármacos presentan múltiples efectos secundarios, algunos no tienen los estudios clínicos finalizados y su consumo sólo se justifica en pacientes con un IMC igual o mayor a 30 Kg/m<sup>2</sup> o en pacientes con factores de riesgo (diabetes o dislipidemias) con un IMC igual o mayor a 27kg/m<sup>2</sup>.

Los productos farmacológicos que se encuentran en el mercado son cada vez más numerosos (Figura 26) y se dividen en dispositivos médicos y fármacos.



**Figura 26.** Mercado global en el tratamiento farmacológico de la obesidad (Figura de elaboración propia a partir de Med Market Diligence., 2011).

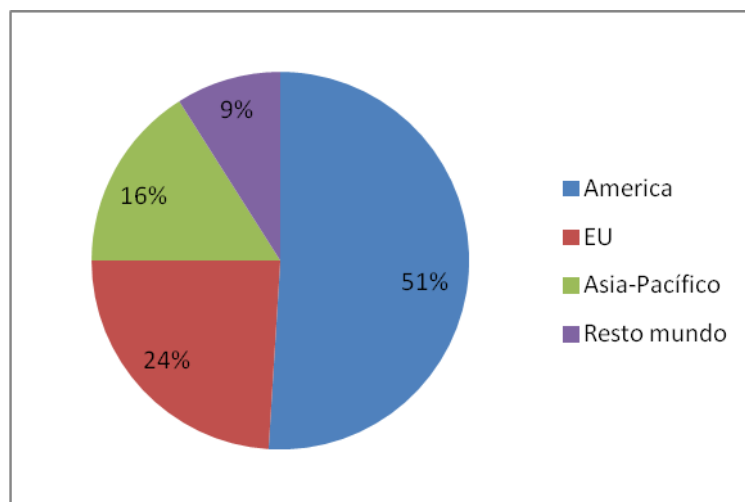
Respecto a los dispositivos médicos, su principio activo va destinado a suprimir el apetito, producir un vaciado gástrico, provocar una sensación de plenitud o impedir la absorción de ciertos nutrientes. Respecto a los fármacos cada vez más se busca la combinación de compuestos con efectos diversos tal y como se muestra en la Figura 27.



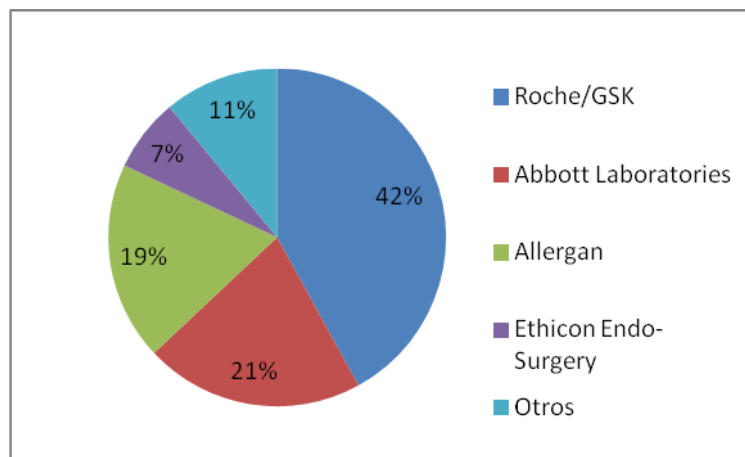
**Figura 27.** Tipos de tratamientos farmacológicos de la obesidad (Figura de elaboración propia a partir de Med Market Diligence., 2011).

*Algunos productos del mercado*

Los países que más invierten en tratamientos farmacológicos se muestran en la Figura 28 y los principales fármacos del mercado son Contrave® Orexigen, Qsymia® Vivus, Belviq® Lorcaserin Arena, Byetta de Amylin Pharmaceuticals / Eli Lilly y Novo Nordisk's Victoza, GI Dynamics EndoBarrier, MetaCure Tantalus, Orlistat y BAROnova Therapeutics TransPyloric Shuttle (TPS), comercializados principalmente por las empresas que se muestran en la Figura 29.



**Figura 28.** Porcentaje de ingresos por país en tratamientos farmacológicos de la obesidad (Figura de elaboración propia a partir de Med Market Diligence., 2011).



**Figura 29.** Porcentaje de ingresos por fabricante (Figura de elaboración propia a partir de Med Market Diligence., 2011).

En 2009, estas cuatro compañías abarcaron el 89% del mercado farmacológico de la obesidad, siendo Roche/GSK líder por Orlistat (\$586.5 millones-42% del total de mercado); Abbott Laboratories líder por Sibutramine (\$300 millones-21% del total de mercado); Allergan líder por Lap-Band (\$268 millones-19% del total del mercado) y Ethicon Endo-Surgery's Realice líder por las bandas gástricas (\$98 millones-7% del total de mercado).

Sin embargo, estos fármacos aunque fueron aprobados por la Food and Drug Administration, presentan múltiples efectos secundarios. Recientemente, dos nuevos medicamentos han sido aprobados por la FDA para el tratamiento de la obesidad. En primer lugar Qsymia (Vivus), aprobado en julio de 2012 (US Foods and Drug Administration: FDA approves Qsymia, 2013; FDA approves Belviq, 2013) es un fármaco compuesto por una combinación de fentermina, supresor del apetito, con topiramato, compuesto anticonvulsivo contra la migraña. Qsymia está aprobado sólo para las personas obesas o con sobrepeso tipo II (un IMC de 27 o más) que sufren además hipertensión, diabetes tipo 2 o colesterol alto. Un estudio financiado por Vivus encontró que los pacientes obesos que tomaban Qsymia perdieron un promedio de 10 kilos en un año, al tiempo que reducían sus niveles de presión arterial y colesterol. No obstante, puede generar efectos secundarios como palpitaciones del corazón y defectos de nacimiento si lo toman mujeres embarazadas. En segundo lugar, el mecanismo de acción de la Lorcaserina (Arena Pharmaceuticals) consiste en provocar pérdida de apetito mediante una acción agonista sobre los receptores de la serotonina situados en el cerebro, lo cual ocasiona sensación de saciedad. Este fármaco está aprobado sólo para pacientes con IMC mayor de 30, o en aquellos con IMC mayor de 27 que presenten también otras patologías asociadas a la obesidad, como diabetes, hipertensión arterial o niveles elevados de colesterol en sangre. Su dispensación solo está autorizada bajo prescripción médica (Rubin R., 2012).

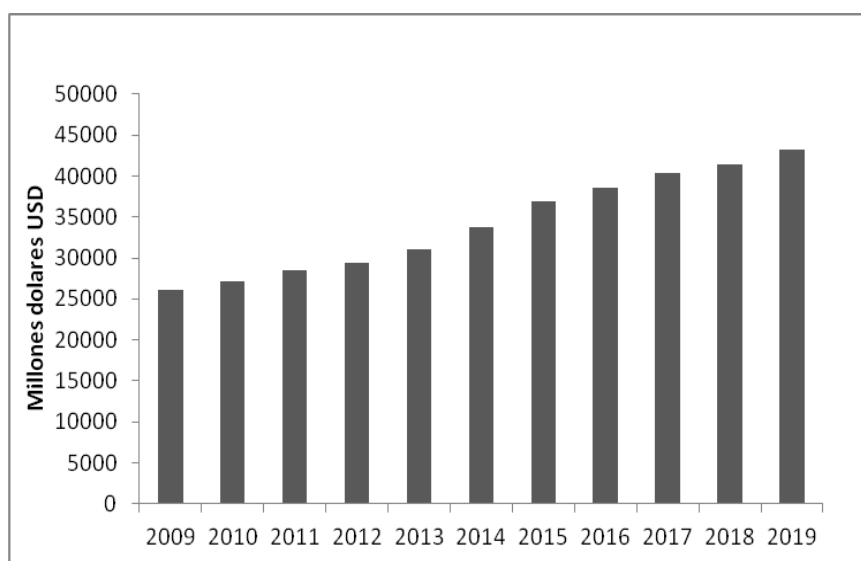


Según distintos analistas, en los próximos años, en Europa, el mercado de la obesidad también estará dominado por los tratamientos combinatorios (MedMarket Diligence, 2011).

#### 4.4.2. Productos para el tratamiento preventivo

Dado que el tratamiento farmacológico de la obesidad agrupa una serie de medicamentos con notables efectos secundarios y altos costes (de Simone G et al., 2008; Karamadoukis L et al., 2009; Slovacek L et al., 2008; Thurairajah PH et al., 2005), el uso de productos preventivos es una alternativa cada vez más valorada para el control de la obesidad si los hábitos de vida saludable no son suficientes (Mayer MA et al., 2009; Park MY et al., 2005).

Así como con los medicamentos, existe una demanda creciente de productos preventivos para la obesidad en los últimos años y la previsión futura es prometedora (Figura 30). La industria alimentaria y de complementos nutricionales trata de elaborar nuevas dietas, alimentos o complementos que permitan mejorar el estado de salud (Market analysis report., 2009).



**Figura 30.** Mercado global para el tratamiento preventivo de la obesidad (Figura de elaboración propia a partir de Markets and Markets., 2013).

Actualmente, una variedad de productos naturales, incluidos extractos crudos o compuestos purificados de plantas, pueden producir una pérdida de peso y usarse para el tratamiento de la obesidad (Han LK et al., 2005a, Moro CO et al., 2000; Rayalam S et al., 2008).

Según datos de mercado, en 2013, el 56% de los adultos trató de bajar de peso y el 27% de mantenerlo (IFIC., 2013). Las personas entre 45-64 años eran las más interesadas en perder peso mientras que los mayores de 65 años eran más propensos a mantenerlo

(Packaged Facts., 2013). Sólo el 29% es parcialmente consciente de las calorías que consumen mientras que el 9% lo es plenamente (IFIC., 2013).

Los alimentos funcionales para control de peso constituyen una de las categorías más importantes dentro del mercado de los alimentos funcionales. Este mercado sigue siendo pequeño si lo comparamos con el mercado total de alimentos y bebidas, aunque cada año las ventas en todo el mundo de este tipo de productos se está incrementando, especialmente en aquellos productos donde se ha autorizado el uso de una alegación funcional (Verbeke W., 2005; Hailu G et al., 2009). En los últimos tres años, Estados Unidos se ha posicionado para liderar el mercado en alimentos funcionales. Según un estudio de Global Industry Analysts, se prevee una facturación de más de 100.000 millones de euros, cerca de un 40% de los cuales pertenecen al mercado norteamericano, líder tanto en producción como en consumo de estos productos. Además de Estados Unidos, Japón y la Unión Europea están muy bien posicionados en este sector, que prevé una importante expansión en los próximos años en países con gran potencial industrial como China, India, Australia, Malasia o Corea del Sur. En Europa, los alimentos funcionales mueven anualmente alrededor de 25.000 millones de euros, de los que el 29% corresponden a Reino Unido, el 22% a Francia, el 16% a Alemania, el 11% a España y Holanda y el 6% a Finlandia. La preocupación por unos hábitos de vida más saludables ha llevado, en algunos países como Italia, a consumir grandes cantidades de Danacol (75 millones de euros facturados en 2010) y Activia (3.000 millones de euros facturados en el mundo). España concretamente, cuenta con más de 200 alimentos funcionales y alrededor del 69% de los hogares los consumen, cifra que alcanza un 80% en los hogares en Estados Unidos. Aquí, el mayor porcentaje de compra se produce en los alimentos funcionales bajos en grasa (56%), aquellos que aportan fibra (44%), los denominados light (41%), los enriquecidos en calcio (33%), los que aportan vitaminas (18%), los que tienen un bajo contenido en sal (17%) y los que contribuyen a reducir el colesterol (15%) (Murcia JL., 2013).

#### *Algunos productos del mercado*

El mercado de control de peso más grande del mundo lo engloba USA, con aproximadamente dos tercios de las ventas, basadas principalmente en productos adelgazantes y suplementos. Algunos alimentos o complementos nutricionales que se comercializan a día de hoy para prevenir la aparición de la obesidad han sido patentados y sus efectos han sido demostrados con estudios científicos.

La sociedad lidera el área en la formulación de nuevos alimentos para el control de peso. Los productos saciantes generaron unas ventas aproximadas de 7.500 millones \$ en 2005 y 26.000 millones \$ en 2009, correspondiendo más del 20% a bebidas, 7% a panes, 3% a snacks y 2% a productos lácteos. Algunos de los principales productos saciantes comercializados son Dannon Light & Fit Protein Shakes, Slim –Fast Hunger

shot daily dose drink in UK, Pepsico's new Aquafine Alve Satiety, Moff's-Fiber fortified applesauce cups, Coca Cola-Nestlé Enviga green tea drink, steaz sparkling green tea, las fibras y cereales de General Mills y Chobani Oats (Chobani) (Food Business News., 2014; Saarela M., 2011). En USA, 36% de la población consume alimentos funcionales para el control de peso, siendo al saciedad el aspecto más buscado en estos productos por el 53% de los consumidores (Saarela, 2011). En Europa, algunas empresas han tratado de introducir en el mercado productos para el control de peso corporal como unos fideos con glutamato, una magdalena con manzana que contiene beta glucanos (gluco control), un extracto de frijol blanco con capacidad de reducir el peso corporal, el glucomanan y un extracto de patata (Slendesta<sup>®</sup>). Las alegaciones concedidas por EFSA han sido asignadas a Tonalin TG80 de Cognis y Clarimol de Lipid Nutrition, aprobado para su uso como ingrediente en yogures, bebidas, productos a base de cereales y complementos dietéticos. Algunos ejemplos adicionales de alimentos funcionales presentes en el mercado de productos para el control de peso se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Productos del mercado para la obesidad con capacidad de producir saciedad (Tablas de elaboración propia a partir de datos del mercado).

Producto	Ingrediente funcional y efecto	Empresa
	<b>Fibra soluble de maíz o trigo</b> que produce saciedad (Resultados estudios : reducción de la ingesta calórica y del peso corporal)	
	<b>Emulsión de lípidos naturales</b> a base de gotas de aceite de palma recubiertas de aceite de avena que produce saciedad (Resultados estudios : liberación de GLP-1)	
	<b>Fibra soluble (beta glucano)</b> que produce saciedad (Resultados estudios : inhibe la liberación de grelina y aumenta la de GLP-1 y el péptido YY)	
	<b>Ingrediente derivado del azafrán</b> que produce saciedad (Resultados estudios : Activación serotonina)	
	Extracto de aceite de nuez de pino de Corea, rico en ácidos grasos de cadena larga, que produce saciedad (Resultados estudios: estimula la liberación de CCK y GLP-1)	

Producto	Ingrediente funcional	Empresa
 <p>Fabenol® Phaseolus vulgaris Extract - A Natural Carbohydrate Blocker</p>	<p><b>Extracto de <i>Phaseolus vulgaris</i></b> que bloquea la absorción del almidón de la dieta (Resultados estudios : Inhibición de la <math>\alpha</math>-amilasa y por tanto de la formación de azúcares por la hidrólisis del almidón)</p>	 <p>SABINSA</p>
 <p>Patented Garcinia cambogia Citrin</p>	<p><b>Extracto de <i>Garcinia cambogia</i></b> a base de sal de potasio de ácido hidroxicitrico (HCA) (Resultados estudios : Suprime la lipogénesis , estimula el metabolismo de la quema de grasa y disminuye el apetito)</p>	 <p>SABINSA</p>
 <p>ForsLean A New Perspective on Weight Management LeanGard</p>	<p><b>Extracto en polvo de las raíces de la planta <i>Coleus forskohlii</i>, forskolin</b>, (Resultados estudios : Llevados a cabo en India, Japón y EEUU, forskolin estimula la adenyl cyclase y dispara la producción de HSL favoreciendo la lipólisis y consecuentemente la pérdida de peso). Forma parte del grupo "LeanGard" que mejora la actividad termogénica, y suprime el apetito.</p>	 <p>SABINSA</p>
 <p>GarCitrin® LeanGard</p>	<p><b>Extracto estandarizado obtenido de las cáscaras de frutos secos de la <i>Garcinia cambogia</i></b> ((-) ácido hidroxicitrico y garcinol). (Resultados estudios : Durante el ensayo de 12 semanas, los valores medios en para el peso corporal y el contenido de grasa disminuyeron significativamente). Forma parte del grupo "LeanGard"</p>	 <p>SABINSA</p>
 <p>Pharx Pharx Pharx "Comprehensive, Safe &amp; Effective" "Weight Management &amp; Metabolic Support Program"</p>	<p><b>Extracto de frijol blanco bloqueador de los hidratos de carbono</b> (Resultados estudios : Reduce el índice glucémico y el peso corporal)</p>	 <p>PHARMACHEM LABORATORIES</p>
 <p>CarbLite</p>	<p>Ingrediente que disminuye la digestión y la absorción de azúcares simples e hidratos de carbono complejos (Resultados estudios: reducción peso corporal)</p>	 <p>ingredia NUTRITIONAL</p>
 <p>InSea 2TM</p>	<p>Ingrediente que disminuye la digestión y la absorción de azúcares simples e hidratos de carbono complejos (Resultados estudios: reducción peso corporal)</p>	 <p>innoVactiv Experts in science-based ingredients</p>

Producto	Ingrediente funcional	Empresa
	Extracto del capsicum, de la cafeína, piperina (extracto de pimienta negra) y de la niacina (Resultados estudios : Estimula la termogénesis, aumenta la oxidación de grasas y la eliminación de lípidos)	
	Extracto de naranja amarga que actúa como ingrediente termogénico (Resultados estudios : reducción del peso corporal y supresión del apetito)	
	Metabolito de DHEA que actúa como ingrediente termogénico (Resultados estudios : pérdida de grasa corporal)	
	Carotenoide que incrementa la termogénesis (Resultados estudios: actúa en el organismo aumentando los niveles de la enzima SIRT-1, reduciendo la acumulación de la grasa y rompen los nódulos de grasa. También reduce los niveles séricos de triglicéridos)	
	Acido linoleico conjugado que favorece la termogénesis (Resultados estudios: Inhibe la lipogénesis, aumenta la síntesis de proteínas desacoplantes y reduce peso corporal)	
	L- carnitina (o vitamina BT) incrementa la termogénesis transportando los ácidos grasos al interior de la célula (Resultados estudios: reducción del peso corporal)	
	Extracto de Garcinia cambogia y picolinato de cromo que frena eficazmente el apetito e inhibe la producción de grasa al incrementar la termogénesis (Resultados estudios: reducción del peso corporal)	
	Ingrediente que inhibe la adipogénesis (Resultados estudios: reducción pesos, IMC, colesterol , triglicéridos y niveles de adiponectina)	
	Té verde con epigallocatechin gallate con capacidad lipolítica y termogénica (Resultados estudios: reducción del peso corporal)	
	Hidrato de derivado de la sacarosa, que al unirse con otros azúcares mejora la difusión del suministro energético por nuestro cuerpo (Resultados estudios: reducción del peso corporal)	

### III. EL CACAO Y SUS PROPIEDADES SALUDABLES

#### 1. El cacao: taxonomía, variedades y composición

*Theobroma cacao* L. es el nombre científico que recibe el cacaotero o árbol del cacao. Se trata de una planta de hoja perenne de la familia Malvaceae de la que se han descrito veintidós especies destacando *Theobroma cacao* L. (*T cacao* L.) y *Theobroma. bicolor* Humb. & Bonpl. *T cacao* L. tiene una significativa importancia comercial y engloba *T. cacao* ssp. *Cacao* (conocido como la variedad criollo) que presenta frutos alargados con surcos pronunciados y semillas blancas y *T. cacao* ssp. *sphaerocarpum* (conocido como la variedad forastero) que presenta frutos redondeados con surcos escasamente evidentes y semillas de color púrpura (Figuras 31 y 32).



**Figura 31.** Interior de un fruto de cacao con características de tipo criollo.



**Figura 32.** Aspecto interno y externo de un fruto de cacao con características de tipo forastero.

La variedad Criollo representa el 5% de las plantaciones mundiales dada su extrema capacidad para desarrollar enfermedades y da lugar al cacao fino. Sin embargo esta variedad es conocida por su destacado aroma, por lo que se destina a productos de alta gama. La variedad Forastero representa casi el 80% de la producción mundial aunque presenta un aroma poco pronunciado y un sabor amargo. Finalmente, la variedad Trinitario, híbrido natural de las variedades anteriores, representa un 15% de la producción mundial de cacao.

Respecto a la composición de la semilla, condicionada por el genotipo o las condiciones de crecimiento del árbol, ésta determina las propiedades nutricionales y sensoriales del

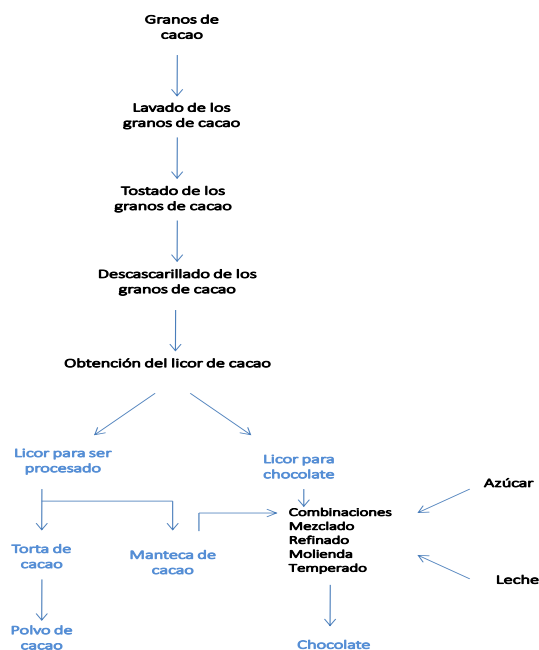
cacao. La fracción responsable de estas propiedades es la lipídica, que representa aproximadamente la mitad del peso de las semillas descascarilladas y secadas y predominan los ácidos grasos saturados. Entre ellos, el ácido esteárico (C18:0 - 35%) y el ácido palmítico (C16:0 - 25%) representan una fracción importante, pero también contienen una alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados representados, casi exclusivamente, por el ácido oleico (C18:1 - 35%), y por el linoleico (C18:2 - 3%) respectivamente. El resto corresponde a proteínas (11-16%), a hidratos de carbono (6-9%), a sales minerales (2,6-4,2%), a fibra (2,1- 3,2%) y a agua (2-5%). Respecto al contenido en vitaminas y minerales, la semilla de cacao es rica en estos nutrientes, muchos de los cuales siguen estando presentes en altas concentraciones en los distintos subproductos. También presenta un contenido considerable en alcaloides de la familia de las metilxantinas, siendo mayoritaria la teobromina (Bucheli P et al., 2001). Respecto a su contenido proteico, en el cacao hay cuatro tipos de proteínas: las albúminas (52%) solubles en agua, las globulinas (43%) solubles en solución salina, las prolaminas, solubles en alcohol y las glutelinas solubles en disoluciones ácidas o alcalinas. Los cambios en la composición de la proteína del cacao ocurren durante la fermentación y el tostado.

## **2. La industria del cacao**

### 2.1. Proceso de transformación de la semilla de cacao

La transformación industrial de la semilla del cacao consta de una variedad de operaciones que persiguen la obtención de diferentes tipos de productos. Para la elaboración del chocolate no se ha descrito ningún procedimiento completamente uniforme, sin embargo existen rangos operativos comunes que son compartidos por empresas molineras de cacao y de manufactura de chocolate.

Dentro del proceso productivo del cacao en grano, una de las etapas de mayor importancia es el proceso de fermentación, donde se generan una serie de cambios químicos en los granos que desarrollan el color del producto final. Este proceso se lleva a cabo por bacterias y levaduras presentes en el ambiente, que se multiplican en la pulpa que rodea los granos de cacao, debido a su alta concentración en azúcares. La pulpa, tras el proceso de fermentación, se descompone en ácido y alcohol. Su color cambia del púrpura al marrón chocolate y el olor a cacao empieza ya a manifestarse en este proceso. El objetivo de esta fermentación es doble: en primer lugar la pulpa se convierte en ácido acético que se evapora y aumenta el tamaño de la semilla. En segundo lugar, se reduce el amargor y la astringencia, y se desarrollan los precursores del aroma. La calidad de los granos de cacao dependerá de este proceso de fermentación. A continuación, las semillas se secan y se prensan, y a partir de este momento se pueden utilizar como materia prima para la elaboración del licor de cacao, del polvo de cacao y de la manteca de cacao (Figura 33).



**Figura 33.** Diagrama tecnológico de la elaboración del chocolate y sus subproductos (Figura de elaboración propia a partir de Liendo RJ 2005).

## 2.2. Productos y subproductos generados

El licor de cacao (o cacao en pasta) es el producto obtenido de la molienda de los granos de cacao sin cáscara. A menudo, los fabricantes mezclan diversos tipos de granos para lograr la calidad, el aroma y el sabor requerido. Este producto puede sufrir posteriormente un proceso de alcalinización para alterar su color y sabor, y también su composición química.

La manteca de cacao se extrae de este licor y representa entre 47-60% (Codex Alimentario 2014). La manteca de cacao o aceite de teobroma es la mezcla de ácidos grasos (principalmente palmítico, esteárico y oleico, con una pequeña cantidad de ácido linoleico), obtenida al someter la masa o licor de cacao a presión y calor. A temperatura ambiente presenta la forma de placas sólidas mientras que en estado fundido es un líquido oleoso. Tiene un suave aroma y sabor a chocolate y es el único componente del cacao usado en la fabricación del chocolate blanco.

La torta de cacao es el producto obtenido por eliminación completa o parcial de la grasa del cacao sin cáscara ni germen y del que se obtiene el polvo de cacao. Cuando el producto obtenido después del desgrasado por prensado proviene de granos con cascarilla se denomina Barquillo y se considera un subproducto de la industria del cacao. Así como el Barquillo, la cascarilla es otro subproducto que se genera del tratamiento de la semilla del cacao y se utiliza para la alimentación animal (300g/kg) y la fermentación de la misma incrementa su valor nutritivo y su uso un 20% (Watson RR et



al., 2013). Las cenizas obtenidas de la cascarilla quemada contienen 40% de cloruro potásico que permite su uso como fertilizante. Dado que del cacao sólo se aprovecha la semilla, que representa en peso 33% (Appiah MR., 2003), el Instituto de Ghana del Cacao inició un proyecto de revalorización de subproductos en 1965 con un comité de expertos. Con el paso de los años, a este Instituto se han incorporado el Departamento de Ciencia Animal y el Instituto de Investigación Animal así como el departamento de Ingeniería Mecánica, tanto para obtener jabones o cremas (Agyente-Badu CK et al., 2003ab) como productos para ganadería o fertilizantes.

El chocolate es el principal producto obtenido del cacao a partir de la manteca. Se define como una suspensión semisólida de partículas sólidas muy finas de azúcar y cacao dispersas en una fase continua de grasa (Khampuis HJ., 2010). Según el Código Alimentario Español (CAE 1997) y la directiva 2000/36/CE del Parlamento Europeo (2000), el chocolate se considera un alimento estimulante y se define como el producto obtenido por la mezcla íntima y homogénea de cantidades variables de cacao en polvo o pasta de cacao y azúcar finamente pulverizada, con o sin adición de manteca de cacao, con un contenido del 35% de componentes del cacao, como mínimo. El contenido de cacao seco desengrasado no debe ser inferior al 14%, ni el de manteca de cacao inferior al 18%, todo ello expresado sobre materia seca.

### 2.3. Propiedades nutritivas y sensoriales del chocolate

La composición nutricional del chocolate depende del contenido de sólidos de cacao, de azúcar y de otros ingredientes. Los hidratos de carbono son la fracción mayoritaria y el contenido total varía entre el 45 y el 65% en función del tipo de chocolate.

El contenido graso del chocolate es elevado (29-43%) proviene mayoritariamente de la manteca de cacao. En esta matriz, los ácidos grasos están organizados como triglicéridos, siendo los ácidos grasos mayoritarios el ácido oleico, palmítico y esteárico (Simoneau C et al., 1999) y su proporción varía en función de la región y del tipo de producto que se elabore. La estructura de los triglicéridos afecta directamente al comportamiento del chocolate durante el procesado industrial y a las características finales del producto como la textura, la viscosidad, la fusión en boca, el sabor y el aroma (Afoakwa E., 2010).

La fracción proteica del chocolate varía dependiendo del tipo de chocolate (5-15%) y la fuente de fibra se pierde cuando las semillas son procesadas. El contenido en minerales varía en función de los ingredientes utilizados, siendo el potasio el mineral mayoritario (559-715mg en 100g de chocolate negro), seguido del magnesio (146-228mg en 100g de chocolate negro) y el fósforo (206-308mg en 100g de chocolate negro). En el caso de las vitaminas, el contenido también se ve afectado por el resto de ingredientes del chocolate. La niacina (0,7-1,1mg en 100g de chocolate negro), la vitamina A (39-50UI en

100g de chocolate negro) o la vitamina E (0.5-0.6mg en 100g de chocolate negro) son algunas de las mayoritarias.

Además de las propiedades nutricionales del chocolate, las propiedades sensoriales son las que han permitido definir este producto como “el alimento de los Dioses”. Especialmente por su sabor, el chocolate se ha convertido en uno de los productos más deseados en todo el mundo (Rozin P et al., 1991). La calidad sensorial final del chocolate depende de la apariencia, del olor, del aroma, del gusto, del sabor y de la textura del mismo. Estos atributos se originan en los precursores del aroma y en los tratamientos post-cosecha, así como también a partir de los ingredientes utilizados y las técnicas de procesado, especialmente durante la fermentación y el secado de los granos de cacao (Kattenberg HR et al., 1993).

Finalmente, existen otros factores determinantes para afirmar que el chocolate es un producto de calidad. Según la ISO (International Organization for Standardization) (1986) la calidad se define como “la totalidad de rasgos y características de un producto que influyen en su capacidad para satisfacer las necesidades explícitas o implícitas”. Otros autores lo definen como “la contribución a la satisfacción de las necesidades de los clientes” (Beamon BM et al., 1998).

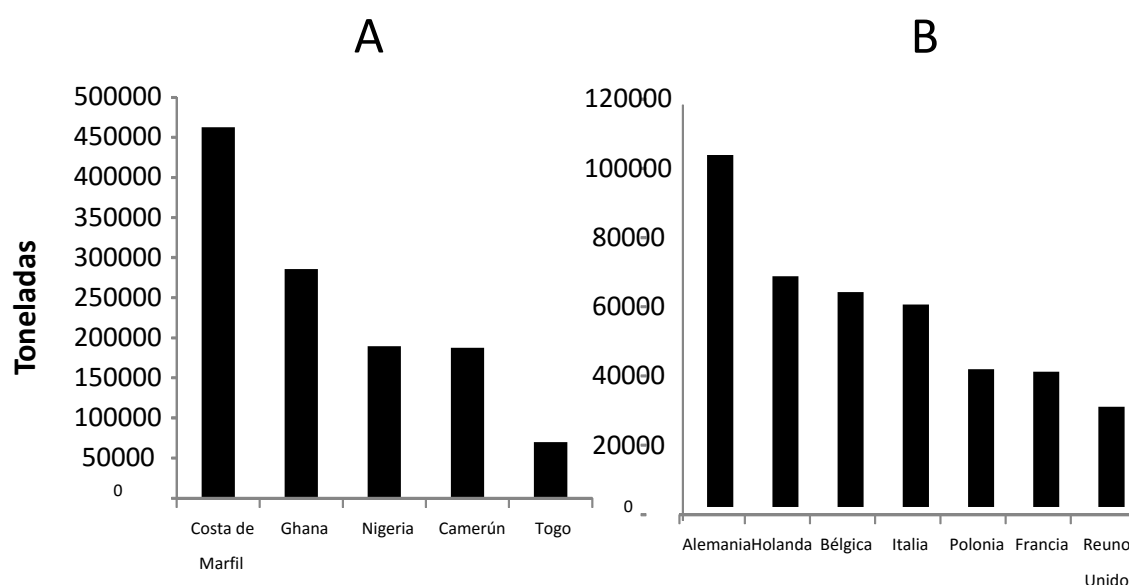
Cada vez hay un mayor interés por parte de la industria alimentaria en entender el comportamiento del consumidor, en aprender acerca de sus actitudes cambiantes y en conocer las percepciones de los consumidores más influyentes. Aún teniendo en cuenta todos los aspectos que afectarán a la calidad final del chocolate, los productos más exitosos serán aquellos que respondan a las necesidades del consumidor y que le produzcan un elevado grado de satisfacción (Heldman DR., 2004). Esta satisfacción será el resultado de un proceso de desarrollo de calidad desde el inicio, donde se debe estudiar principalmente la influencia que tiene la composición y la interacción de los distintos ingredientes sobre las propiedades físicas y sensoriales del producto final pero también se deben considerar otros factores como la seguridad microbiológica, la toxicidad, el precio, la marca, el etiquetado y las propiedades saludables o de seguridad del alimento (Mela DJ., 2001).

### **3. El mercado del cacao**

La producción mundial del cacao ronda los cuatro millones de toneladas y del total de granos cosechados 74,8% se cultivan en África, 13% en Asia y 12,1% en América. El cacao ocupa el tercer lugar, después del azúcar y el café, en el mercado de las materias primas (Mercasa., 2014).

Esta actividad económica se lleva a cabo por pequeños productores que proveen aproximadamente el 95% de la producción mundial ocupando a más de 14 millones de personas en todo el mundo en la producción primaria de cacao (ICCO., 2010). Cinco

países concentran más del 90% de la producción que exportan a la UE en forma de cacao en grano (Figura 34A) y éste se procesa para fabricar chocolate y productos de cacao que se exportan desde la UE (Figura 34B).



**Figura 34.** Distribución de la producción de cacao en grano (ICCO., 2010).

A nivel de consumo de cacao en grano, domina Europa con un 48%, seguido de Norte América (25%), Asia y Oceanía (15%), Sud América (9%) y África (3%).

A nivel de las importaciones, en Europa domina Holanda, Alemania y Bélgica como principales países importadores de grano de cacao con unos volúmenes de 1.597, 490, 434 millones de euros respectivamente. El resto de productos derivados de cacao y sus importaciones se muestran en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Principales importadores de la UE de productos de cacao (ICCO., 2010).

Cacao en grano	Manteca de cacao	Cacao en pasta	Polvo de cacao
Países Bajos (38%)	Alemania (21%)	Francia (19%)	Alemania (19%)
Alemania (20%)	Bélgica (17%)	Alemania (18%)	Francia (15%)
Bélgica (11%)	Países Bajos (17%)	Países Bajos (16%)	Italia (12%)
Francia (10%)	Francia (16%)	Bélgica (14%)	Inglaterra (8.8%)
Inglaterra (7.5%)	Inglaterra (10%)	Polonia (11%)	Bélgica (7.2%)
<b>Total EU: 2,95 mil millones de euros (1,7 millones de toneladas)</b>	<b>Total EU: 1,8 mil millones de euros (418.000 toneladas)</b>	<b>Total EU: 745 millones de euros (376.000 toneladas)</b>	<b>Total EU: 324 millones de euros (238 miles de toneladas)</b>

Respecto a España, dado que no es productora de cacao, toda la materia prima debe ser importada, pese a que los precios se han incrementado un 77% desde 2008 (Mercasa., 2014). Los principales proveedores son Francia (39,4%), y Alemania (25,1%) y gracias a las estrategias de innovación y los nuevos lanzamientos, por parte de las principales empresas del sector, el mercado español de chocolate y derivados del cacao continua siendo un mercado muy dinámico. En los últimos años, la producción total de las empresas fabricantes y comercializadoras en nuestro país llegó a 265.115 toneladas que generaron un valor de 1.501,7 millones de euros. A nivel interno se vendieron 204.310 toneladas con un incremento del 2% y un valor de 1.132,8 millones de euros, siendo la tableta de chocolate el producto que registró mayor número de ventas (33% de las ventas).

El mercado del chocolate y derivados del cacao está dominado por pocas y grandes empresas multinacionales, donde Nestlé España S.A., grupo líder del sector con una producción en nuestro país de 42.000 toneladas, registró unas ventas de 1.450 millones de euros, de los cuales 346,2 millones de euros corresponden a la división chocolates y cacao. En segunda posición, Mondelez International Group produjo 38.100 toneladas y registró unas ventas de 640 millones de euros, de los cuales 200 millones de euros corresponden a la división chocolates y cacao. En tercera posición, Nutrexpa S.L. produjo 31.000 toneladas y registró una ventas de 396,07 millones de euros, de los cuales 156 millones de euros corresponden a la división chocolates y cacao. Finalmente Natra S.A. División Chocolates y Cacao registró 325,62 millones de euros y Ferrero Ibérica S.A., Lacasa S.A. group, Indcre S.A., Barry Callebaut, Nederland S.A., Dulcesol S.L son el resto de empresas nacionales del sector de derivados del cacao (Alimarket., 2013).

Respecto al consumo, los hogares españoles consumieron 165,3 millones de kilos en 2013 y gastaron 1.080,8 millones de euros en productos de cacao (Mercasa., 2014) siendo el cacao soluble y las tabletas los productos más consumidos. En términos per cápita esto representa 3,6 kg y 23,8 euros. Considerando las características sociodemográficas, cabe destacar que los hogares de clase alta y media mantuvieron un consumo más elevado así como aquellos hogares con niños de 6 a 15 años. El consumo de chocolate y derivados también es importante en hogares donde la persona encargada de hacer la compra trabaja en el hogar y tiene una edad entre 35 y 49 años y en aquellos hogares formados por una sola persona. También los consumidores que residen en poblaciones de entre 100.000 y 500.000 habitantes, cuentan con un mayor consumo de productos de cacao, destacando el País Vasco, Cantabria y La Rioja. Respecto al punto de venta, el supermercado representa el 71,7% de la cuota de mercado.

En el mercado del chocolate y derivados del cacao hay una evolución creciente de la demanda dado que, durante los últimos cinco años, su consumo ha aumentado 0,2kg por persona y año y el gasto per capita en 2,9 euros (Mercasa., 2014).

## 4. El cacao y sus propiedades en la salud

### 4.1. Los polifenoles del cacao

Los polifenoles son los compuestos del cacao más estudiados a nivel funcional (Cooper KA et al., 2007). En la semilla de cacao, los polifenoles se encuentran en las células pigmentadas, los cotiledones y, dependiendo de la cantidad de los mismos, tienen una coloración desde blanca hasta púrpura. Los tres grupos de polifenoles presentes en la semilla de cacao se clasifican en antocianidinas (4%), proantocianidinas (58%) y catequinas o flavan-3-ols (37%), siendo la catequina la mayoritaria (35%), seguida por la epicatequina y sus dímeros (procianidina B1 y B2) (Wollgast J., 2000).

Aparte de los polifenoles mayoritarios del cacao se han identificado y cuantificado, en los granos de cacao, procianidina B3, B4, B5, C1 y D, quercetina, quercetina-3-Oglucoside (isoquercitin), quercetina-3-O-galactósido (hiperósido), quercetina-3-O-arabinósido, apigenina, apigenina-8-C-glucósido (vitexina), apigenina-6-C-glucósido (isovitexin), luteolina y luteolina-7-Oglucoside, dihidroquercetina, dihydroxykaempferol, kaempferolrutinoside, naringenina, naringenina-glucósido y miricetina-glucósido (Sánchez-Rabameda F et al., 2003). Las procianidinas formadas por la unión de 2 a 6 monómeros de epicatequina son las más abundantes, mientras que las que contienen entre 2 y 5 monómeros son las formas más activas. En el cacao, el contenido de estos flavanoles oscila entre 460-610mg/kg (Manach C et al., 2004).

Entre las propiedades funcionales de los polifenoles, se ha descrito, principalmente, su capacidad antioxidante, antihipertensiva y antiinflamatoria.

#### 4.1.1. Capacidad antioxidante de polifenoles

La capacidad antioxidante de los polifenoles es la actividad responsable del efecto preventivo que se les atribuye frente a determinadas enfermedades frecuentes en los países desarrollados, como la enfermedad cardiovascular y el cáncer epitelial (Wang JF., 2001; Kondo K et al., 1996).

Actualmente hay mucha literatura científica que demuestra que los flavonoides del chocolate pueden proteger los tejidos del estrés oxidativo (Mathur S et al., 2002; Serafini M et al., 2003 y 2004; Mursu J et al., 2004; Fraga CG et al., 2005a; Keen CL et al., 2005; Lotito SB et al., 2006; Vinson JA et al., 2006; Miller KB et al., 2006; Baba S et al., 2007ab; Jalil AM et al., 2008). Además, por estudios *ex-vivo* se ha podido demostrar una reducción de la susceptibilidad del LDL a la oxidación *ex-vivo* (Osabake N et al., 2001) al consumir chocolate. Posteriormente, los estudios de intervención en humanos

han mostrado una disminución de la oxidación de las partículas LDL (Mathur S., 2002) y un aumento de la capacidad antioxidante en el plasma (Serafini M., 2003). Del mismo modo, en estudios de larga duración, el consumo de chocolate se ha asociado con una disminución de los productos de oxidación plasmáticos (Ried K et al., 2010) y un aumento de la capacidad antioxidante en el plasma (Wang JF., 2001).

Por otro lado, los flavonoides del cacao protegen de la hemólisis de eritrocitos que contienen glutatión y protegen de lesiones provocadas por agentes oxidantes como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH\cdot$ ). También se ha demostrado que el consumo de un chocolate rico en flavonoides reduce las cantidades del índice de peroxidación 2-tiobarbitúrico (Medina-Ramón A et al., 2012). Varios autores atribuyen esta capacidad antioxidante de los flavanoles del cacao a la presencia de un grupo catecol en el anillo B que le permite atrapar los radicales libres (Kuhnau J., 1976; Pannala AS et al., 2001), por lo que la capacidad antioxidante se podría incrementar a medida que aumenta la longitud de la cadena del oligómero (Lotito SB et al., 2000).

#### 4.1.2. Efecto de los polifenoles en la salud cardiovascular

Aunque los flavanoles del cacao tienen la capacidad de aumentar el sistema de defensa antioxidante de un individuo, existen otros mecanismos celulares a través de los cuales estos compuestos pueden mejorar la salud cardiovascular (Alonso A et al., 2005). Diversos estudios de intervención en humanos se han llevado a cabo en los últimos diez años (Tabla 14), así como estudios *in vitro* de inhibición de ECA por diferentes muestras de cacao (Actis-Goretta L et al., 2003; Schnorr O et al., 2008).

**Tabla 14.** Publicaciones referentes al efecto de los polifenoles de cacao sobre la salud cardiovascular en los últimos años.

Efecto observado	Fuente	Título
Disminución de la presión sistólica	Taubert D et al., 2003	Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension
	Grassi D et al., 2005a	Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endotheliumdependent vasodilation in hypertensives
	Fraga CG et al., 2005b	Cocoa, diabetes, and hypertension: Should we eat more chocolate?

Disminución de la presión sistólica	Grassi D et al., 2005b	Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons
	Ding EL et al., 2006	Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systemic review
	Buijsse B et al., 2006	Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: The Zutphen elderly study
	Taubert D et al., 2007a	Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial
	Taubert D et al., 2007b	Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis
	Allen RR et al., 2008	Daily consumption of a dark chocolate containing flavanols and added sterol esters affects cardiovascular risk factors in a normotensive population with elevated cholesterol.
	Faridi Z et al., 2008	Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function: a randomized controlled crossover trial
	Grassi D et al., 2008	Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate
	Ried K et al., 2010	Does chocolate reduce blood pressure? A meta-analysis.
	Almoosawi S et al., 2010	The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects.
	Fraga CG et al., 2011	Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure
Zomer E et al., 2012	The effectiveness and cost effectiveness of dark chocolate consumption as prevention therapy in people at high risk of cardiovascular disease: best case scenario analysis using a Markov model	

Inducción de la vasodilatación	Fisher ND et al., 2003	Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide dependent vasodilation in healthy humans
Disminución de la agregación plaquetaria	Murphy KJ et al., 2003	Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa ( <i>Theobroma cacao</i> ) inhibit platelet function
	Innes AJ et al., 2003	Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers.
	Hermann F et al., 2006	Dark chocolate improves endothelial and platelet function
	Engler MB et al., 2006	The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease
	Flammer AJ et al., 2007	Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity
Mejora la actividad del óxido nítrico	Heiss C et al., 2003	Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols
	Heiss C et al., 2005	Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers
	Schroeter H et al., 2006	(-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol rich cocoa on vascular function in humans.
	Fisher ND et al., 2006	Aging and vascular responses to flavonoid-rich cocoa
Mejora la función endotelial	Engler MB et al., 2004	Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults.
	Vlachopoulos C et al., 2005	Effect of Dark Chocolate on Arterial Function in Healthy Individuals
	Wang-Polagruto JF et al., 2006	Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women
	Loke WM et al., 2008	Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men
	Heiss C et al., 2007	Sustained increase in flow-mediated dilation after intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week



Los flavonoides del cacao pueden conferir protección cardiovascular mediante diferentes mecanismos (Wang JF., 2000 y 2001; Brighenti F., 2005). Por un lado, en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares (incluyendo la aterosclerosis y la insuficiencia cardíaca crónica), hay signos de inflamación aguda o crónica. Los factores desencadenantes y los mecanismos que conducen a la inflamación pueden variar entre las distintas condiciones clínicas, pero existen muchos mediadores comunes proinflamatorios, incluyendo los eicosanoides y las citoquinas. Mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* utilizando células endoteliales aórticas, se ha sugerido que las procianidinas del chocolate pueden alterar favorablemente la síntesis de eicosanoides, incrementando la producción de prostaciclina y reduciendo la de leucotrienos (Haslam E., 1998). Además se ha demostrado, en ensayos *in vitro*, que algunos flavonoides derivados del cacao pueden reducir la producción y el efecto de mediadores proinflamatorios, ya sea directamente o actuando sobre las vías de señalización (Selmi C et al., 2006 y 2008; Schewe T et al., 2002). Su mecanismo de acción es bloquear las quinasas y los receptores del factor tumoral y lipopolisacáridos y su cascada de señalización. Esto frena la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B inductores de la expresión de genes de inflamación.

Por otro lado, también se ha estudiado el papel relevante de los polifenoles en la función de las plaquetas en el desarrollo y manifestación del infarto agudo de miocardio. Se ha demostrado que los polifenoles pueden prevenir la trombosis inhibiendo la agregación plaquetaria, la permeabilidad y fragilidad capilar (Mazza G., 2000). Este efecto modulador de la función plaquetaria se ha demostrado mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* (Pearson D et al., 2005).

Otro aspecto a considerar es que la ingesta de cacao conlleva el aumento en plasma de compuestos nitrosos y de factores de vasodilatación (entre otros óxido nítrico) y una disminución de la síntesis de vasoconstrictores. De este modo los flavonoides incrementan la biodisponibilidad del óxido nítrico en las células endoteliales y reducen la peroxidación lipídica de las LDL en presencia de concentraciones significativas de nitrito y metabolitos del óxido nítrico (Grassi D., 2005b).

Actualmente se encuentra en el mercado el producto Acticoa® de Barry Callebaut (tableta de chocolate enriquecida en flavonoides con actividad antihipertensiva) al que EFSA ha concedido una alegación funcional (<http://www.acticoa.com/products/labeling>).

#### 4.1.3. Efecto de los polifenoles sobre las enfermedades neurodegenerativas

El estrés oxidativo se ha asociado con la pérdida neuronal en las enfermedades neurodegenerativas y con la pérdida cognitiva asociada a la edad. Los flavonoides del

cacao tienen la capacidad de proteger a las neuronas contra el daño producido por las neurotoxinas y reducir la inflamación a nivel neuronal (Spencer JP., 2001; Shimada Y et al., 2001). Por ello, los polifenoles de cacao podrían considerarse agentes protectores frente a la apoptosis neuronal causada por el estrés oxidativo, promoviendo la memoria, el aprendizaje y la función cognitiva (Spencer JP., 2009).

El consumo de alimentos ricos en flavonoides, como el cacao y el chocolate, podría limitar la neurodegeneración asociada a una serie de trastornos neurológicos y con ello prevenir o revertir el deterioro cognitivo normal asociado, entre otras, con la enfermedad de Alzheimer (William RJ., 2012). También determinados péptidos del cacao, provenientes de la hidrólisis enzimática de la albúmina, son capaces de reducir la parálisis en la cepa transgénica CL4176 de *C.elegans* que expresa el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> humano así como la acumulación del péptido (Martorell P et al., 2013).

Respecto a la función cognitiva, los flavonoles revierten las reducciones en el rendimiento cognitivo que ocurren con el envejecimiento (Nurck E et al., 2009; Desideri G et al., 2012). También mejoran la función endotelial y reducen la presión sanguínea reduciendo la vasodilatación en la vasculatura periférica y en el cerebro (Sorond FA et al., 2008).

#### *4.1.4. Efecto de los polifenoles en la obesidad*

En los últimos años, un gran número de publicaciones han asignado a los polifenoles del cacao un efecto sobre una reducción del IMC y sobre las lipoproteínas de baja densidad tal y como se demuestra en varios estudios en humanos (Cuenca-García M et al., 2014; Farhat G et al., 2014; Latif R., 2013; Nogueira L de P et al., 2012; Osakabe N et al., 2001). En un estudio llevado a cabo en mujeres de peso normal pero con riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, el consumo de polifenoles de cacao mostró un efecto favorable en los marcadores de hipertensión e inflamación (Di Renzo L et al., 2013). También el consumo de chocolate negro, rico en flavonoides, produjo una vasodilatación de las arterias en adultos con sobrepeso y una reducción de la rigidez arterial en mujeres (West SG et al., 2014). A su vez, en un estudio randomizado cruzado aleatorizado controlado con placebo simple ciego (Almoosawi S et al., 2010) se comparó el efecto de chocolate negro rico en polifenoles sobre los biomarcadores del metabolismo de la glucosa, perfil lipídico y la presión arterial en las mujeres con un IMC $\geq$ 25 (n=21) y mujeres con IMC<25 (n=21). La presión sistólica y diastólica disminuyó después de cuatro semanas tras la ingesta de un polvo rico en polifenoles aunque las mujeres con IMC $\geq$ 25 kg m<sup>2</sup> respondieron de manera menos favorable. No se observaron cambios significativos en el perfil lipídico.

En estudios *in vitro*, se demostró que un extracto de polifenoles de cacao suprimió la adipogénesis en cultivos celulares 3T3-L1 (Min SY et al., 2013). También, en estudios con ratones C57BL/6 un licor de polifenoles previno la hiperglucemia y la obesidad mediante la sobreexpresión del gen UCP-1 y en ratas alimentadas con una dieta alta en grasas, en presencia o ausencia de cacao, se observó una disminución significativa del peso corporal total, así como del tejido adiposo blanco y de los triglicéridos séricos. El análisis de ADN de la grasa en muestras del hígado mostró una reducción en la expresión de diversos genes asociados con el transporte de ácidos grasos y la síntesis de grasa y un aumento en la expresión de genes asociados con termogénesis (West SG et al., 2014). Otros estudios en ratones demostraron que los polifenoles del chocolate reducen la inflamación del tejido adiposo, la resistencia a la insulina y la enfermedad del hígado graso en ratones obesos alimentados con una dieta rica en grasas, principalmente a través de la baja regulación de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido adiposo (Gu Y et al., 2013 y 2014).

#### 4.2. Las proteínas del cacao

Las proteínas representan el 60% de los compuestos nitrogenados de las semillas fermentadas del cacao siendo minoritarios otros compuestos como la teobromina y la cafeína.

Entre las proteínas del cacao, la 21KDa albúmina, que presenta homología con el inhibidor de la tripsina (Spencer ME et al., 1991; Tai H et al., 1991; Voigt J et al., 1993; Kochhar S et al., 2000 y 2001) y la vicilina 7S-globulina son las proteínas mayoritarias (Pettipher GL., 1999; Spencer ME et al., 1992; Mc Henry L et al., 1992). La primera de ellas, que representa el 52% de las proteínas del cacao (Voigt J et al., 1993) es soluble en agua mientras que la segunda, que representa el 43%, es soluble en soluciones salinas. Además de estas proteínas, la glutelina (soluble en soluciones ácidas y alcalinas) y la prolamina (soluble en alcohol) son también proteínas minoritarias del cacao. Durante el proceso fermentativo, las concentraciones en proteína se modifican, incrementándose la cantidad de albúmina (de 52 a 79%) y disminuyendo la de globulina (de 43 a 8,3%). También el proceso de tostado afecta a la albúmina y al contenido en aminoácidos (Bonvehí JS., 2005).

En la semilla fresca de cacao se han detectado numerosas enzimas tales como  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -fructosidasa,  $\alpha$ -amilasa,  $\beta$ -galactosidasa, proteinasa, lipasa, catalasa, peroxidasa. También, la endoproteasa aspártica y la carboxipeptidasa se encargan de liberar aminoácidos hidrofóbicos que tendrán un efecto determinante en el aroma del chocolate (Voigt J et al., 1994; Hashim P et al., 1998). Los precursores del aroma provienen de la vicilina (Voigt J et al., 1993; Kochhar S et al., 2000 y 2001) que está formada por un conjunto de polipéptidos (Voight J et al 1994., Pettipher GL et al., 1999; Spencer ME et al., 1992) que al hidrolizarse generan aminoácidos que reaccionan con

los azúcares libres llevándose a cabo la Reacción de Maillard y favoreciendo la liberación de aromas, generados durante el tostado de las semillas fermentadas (Voigt J et al., 1995). Para conseguir el aroma adecuado se requieren péptidos específicos (Mohr W et al., 1976) y el número de aminoácidos libres es mayor en las semillas fermentadas que en las no fermentadas (Kirchhoff PM et al., 1989; Rohsius C et al., 2006). Los principales aminoácidos presentes en las semillas fermentadas son el ácido aspártico D (82,5mg/g proteína), la leucina L (32,4mg/g proteína), la lisina K (52,6mg/g proteína) y la arginina R (51,4mg/g proteína). En las semillas no fermentadas, estos aminoácidos siguen siendo los mayoritarios pero se encuentran en distintas proporciones: ácido aspártico D (100mg/g proteína), leucina L (72,2mg/g proteína), lisina K (42mg/g proteína) y arginina R (43,6mg/g proteína) (Adeyeye EI et al., 2010).

Respecto a su efecto funcional, las proteínas del cacao son estimulantes del sistema nervioso central, son diuréticas y relajantes (Latif R., 2013). También algunos péptidos del cacao presentan capacidad antineurodegenerativa y antioxidante (Martorell P et al., 2013) y tienen capacidad de inhibir enzimas tales como la tripsina y quimiotripsina bovina (Kochhar S et al., 2000).

Finalmente, en modelo murino se han identificado péptidos funcionales del cacao con actividad antioxidante y antitumoral en el modelo de linfoma murino L5178Y en ratones Balb/c administrando una dosis de 25mg/kg/día durante 15 días (Preza AM et al., 2010). Se investigó la capacidad citotóxica de diferentes fracciones proteicas del cacao (albúmina, globulina y glutelina) sobre las células L5178Y y esplenocitos de ratón sano, observándose que la fracción de albúmina de cacao semifermentado seco mostró actividad antitumoral al disminuir significativamente el volumen de líquido ascítico y el volumen tumoral, inhibiendo el crecimiento celular en  $59,98 \pm 13,6\%$  al 60% de la población. Respecto a la capacidad antioxidante, las fracciones de albúmina y glutelina presentaron mayor capacidad para atrapar radicales libres. El mayor efecto antitumoral lo presentó la fracción de albúmina y su purificación permitió identificar un péptido, con actividad antitumoral y antioxidante, con secuencia de aminoácidos CSDIGRHSDGQIR.

# OBJETIVOS



Teniendo en cuenta que el crecimiento económico de un país depende de la acumulación de conocimiento y de la capacidad para introducir nuevos productos, procesos, servicios, modelos de negocio y métodos organizativos, es conveniente organizar un entorno adecuado para la ciencia, la tecnología y la innovación.

El desarrollo de nuevos productos requiere, no sólo rigurosidad y excelencia en la búsqueda sino también implicar al consumidor y conocer sus preferencias de compra para asegurar el futuro éxito de un nuevo lanzamiento.

Para ello, el objetivo general de este trabajo es doble:

- i) evaluar la demanda de los productos de control de peso por parte del consumidor así como su preferencia de compra
- ii) identificar alternativas innovadoras para la obtención de nuevos ingredientes funcionales en obesidad.

En orden a alcanzar los objetivos planteados, el presente trabajo se ha estructurado en dos partes.

En la primera parte, se ha planteado un estudio de marketing donde se ha analizado la demanda insatisfecha del mercado en relación a los productos de control de peso y se ha evaluado la opinión del consumidor acerca de ciertas características de los mismos. También se han estudiado los parámetros más importantes en relación a los productos actualmente disponibles tratando de comprender al no consumidor para poder diseñar nuevas estrategias y favorecer su consumo. Los objetivos específicos planteados, en esta primera parte, han sido los siguientes:

- Analizar los hábitos de la muestra seleccionada y las preferencias de compra.
- Evaluar el consumo de productos de control de peso.
- Medir la importancia de la prescripción de los productos, así como el punto de venta.
- Estudiar la importancia del etiquetado y de la eficacia del efecto funcional del producto para el consumidor.
- Identificar el grado de satisfacción de los productos actualmente disponibles.
- Medir los motivos de no consumo de productos de control de peso.
- Evaluar la necesidad de mejorar la oferta y la predisposición de pagar más por un producto de alto valor añadido.
- Evaluar la preferencia de formato para el diseño de un alimento funcional.

La segunda parte de este trabajo se ha basado en la identificación de nuevos ingredientes bioactivos para el control de la obesidad a partir de un subproducto de la industria del cacao que permita formular un alimento funcional. Los objetivos específicos planteados, en esta segunda parte, han sido los siguientes:

- Evaluar la actividad funcional de un subproducto del cacao con alto contenido proteico frente a la lipasa pancreática (LP) *in vitro*.
- Obtener un hidrolizado proteico rico en péptidos bioactivos e identificar los péptidos funcionales tras un proceso de purificación.
- Evaluar la actividad funcional de los péptidos purificados *in vitro* y evaluar la capacidad de reducir la grasa corporal en un modelo *in vivo* (*C.elegans*).
- Determinar el mecanismo de acción de los ingredientes funcionales identificados.
- Evaluar la resistencia de los ingredientes funcionales tras su paso por el tracto gastrointestinal.
- Diseñar un posible alimento funcional a partir de los péptidos bioactivos identificados y evaluar el posible efecto sinérgico de diferentes componentes.



Primera parte:

El consumidor de productos de control de  
peso: un estudio empírico



# Materiales y Métodos

## (Primera parte)



## 1. Muestra y procedimiento de obtención de datos

Con la finalidad de obtener un conocimiento detallado del comportamiento del consumidor en relación a los productos de control de peso, se ha llevado a cabo un estudio empírico para evaluar su actitud frente a los alimentos funcionales, complementos nutricionales y fármacos para el control de peso. La investigación se ha basado en un estudio de encuesta online a partir de la cual se ha recogido información y se ha evaluado la naturaleza de la demanda insatisfecha del consumidor, la necesidad de ampliar la oferta actual así como la evaluación de algunos criterios en la decisión de compra del mismo.

Los datos obtenidos de esta investigación y recogidos durante un mes de trabajo de campo, proceden de una muestra de encuestados de entre 18 y 65 años. El procedimiento de contacto con los mismos, consistió en el envío de correos electrónicos en los que se incluía el enlace correspondiente para acceder a la encuesta digital. El análisis de datos se llevó a cabo utilizando la plataforma de desarrollo de encuestas online *Survey Monkey*, después de un proceso de diseño y verificación del cuestionario utilizado.

La muestra consta de 208 individuos seleccionados a partir de una estructura sociodemográfica suficientemente variada como para poder captar las diferentes opciones y comportamientos. La encuesta se envió tanto a particulares como a un colectivo de especialistas en Nutrición y Dietética a través de las siguientes Asociaciones, Colegios y Federaciones.

1. Colegio Oficial de Dietistas y Nutricionistas de la Comunidad Valenciana (Codinuova)
2. Federación Española de Sociedades de Nutrición Alimentación y Dietética (FESNAD)
3. Asociación de Diplomados en Enfermería de Nutrición y Dietética (ADENYD)
4. Asociación Española de Dietistas y Nutricionistas (AEDN)
5. Asociación Española para el Estudio de los Trastornos de la Conducta Alimentaria (AEETCA)
6. Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación (SEDCA)
7. Sociedad Española de Endocrinología y Nutrición (SEEN)
8. Sociedad Española de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SEGHNP)
9. Sociedad Española de Nutrición (SEN)
10. Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE)
11. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO)

12. Sociedad Andaluza de Nutrición Clínica y Dietética (SANDYD)
13. Sociedad Gallega de Endocrinología, Nutrición y Metabolismo (SGENM)
14. Asociación de Dietistas Nutricionistas de Madrid
15. Asociación Gallega de Dietistas y Nutricionistas
16. Fundación Andaluza de Nutrición y Dietética

## 2. Estructura de la encuesta

La encuesta se dividió en un total de 29 preguntas agrupadas en tres grandes bloques tal y como se muestra en el Anexo 1. En primer lugar se analizaron los hábitos de los encuestados y se realizaron tres preguntas en relación a la importancia de la alimentación, la frecuencia en la realización de ejercicio físico y el hecho de haber realizado dieta en algún momento de su vida y por qué razones. También se evaluó la demanda de productos de control de peso y se midió la frecuencia de consumo, dando una breve descripción de los diferentes tipos de formato actualmente existentes (alimentos funcionales, complementos nutricionales y fármacos) así como unas imágenes ilustrativas. A partir de este momento y en segundo lugar, se dividió la muestra en dos grupos, definiendo como grupo A, aquellos encuestados consumidores de productos de control de peso y como grupo B, los no consumidores de los productos de control de peso. Para las personas pertenecientes al grupo A, se averiguó qué producto se había consumido, quien había sido el prescriptor de los mismos así como el grado de satisfacción del último producto consumido, en una escala de Likert del 1-7 siendo 1 en absoluto satisfecho y 7 muy satisfecho. También se evaluó la importancia de ciertas características de este tipo de productos (punto de venta, importancia de estudios científicos que respalden la eficacia del alimento) mediante una escala de Likert del 1-7 siendo 1 en absoluto importante y 7 muy importante. En el caso de las personas pertenecientes al grupo B, se trató de averiguar cuáles eran los motivos del no consumo y en qué medida consumiría estos productos si presentaran ciertas características (mismas características que para el grupo A) mediante una escala de Likert del 1-7 siendo 1 “seguro que no los consumiría” y 7 “seguro que los consumiría”. En tercer lugar, se evaluó la preferencia de productos de control de peso y para aquellos que seleccionaron “alimento funcional” frente a “complemento nutricional”, se analizó la importancia de ciertas características de este tipo de productos como la disposición a pagar más por un producto con una efectividad científicamente demostrada, la valoración de una mayor oferta, la importancia de introducir un ingrediente ya presente en el alimento de origen o un nuevo ingrediente y se evaluó la preferencia de producto entre un listado de bebidas y alimentos. Al final de la encuesta se midieron las variables sociodemográficas y se analizó el sexo, la edad, la renta, el nivel educativo, la situación profesional, el Índice de Masa Corporal (IMC), el país de origen y si eran o no profesionales del sector (Figura 35).

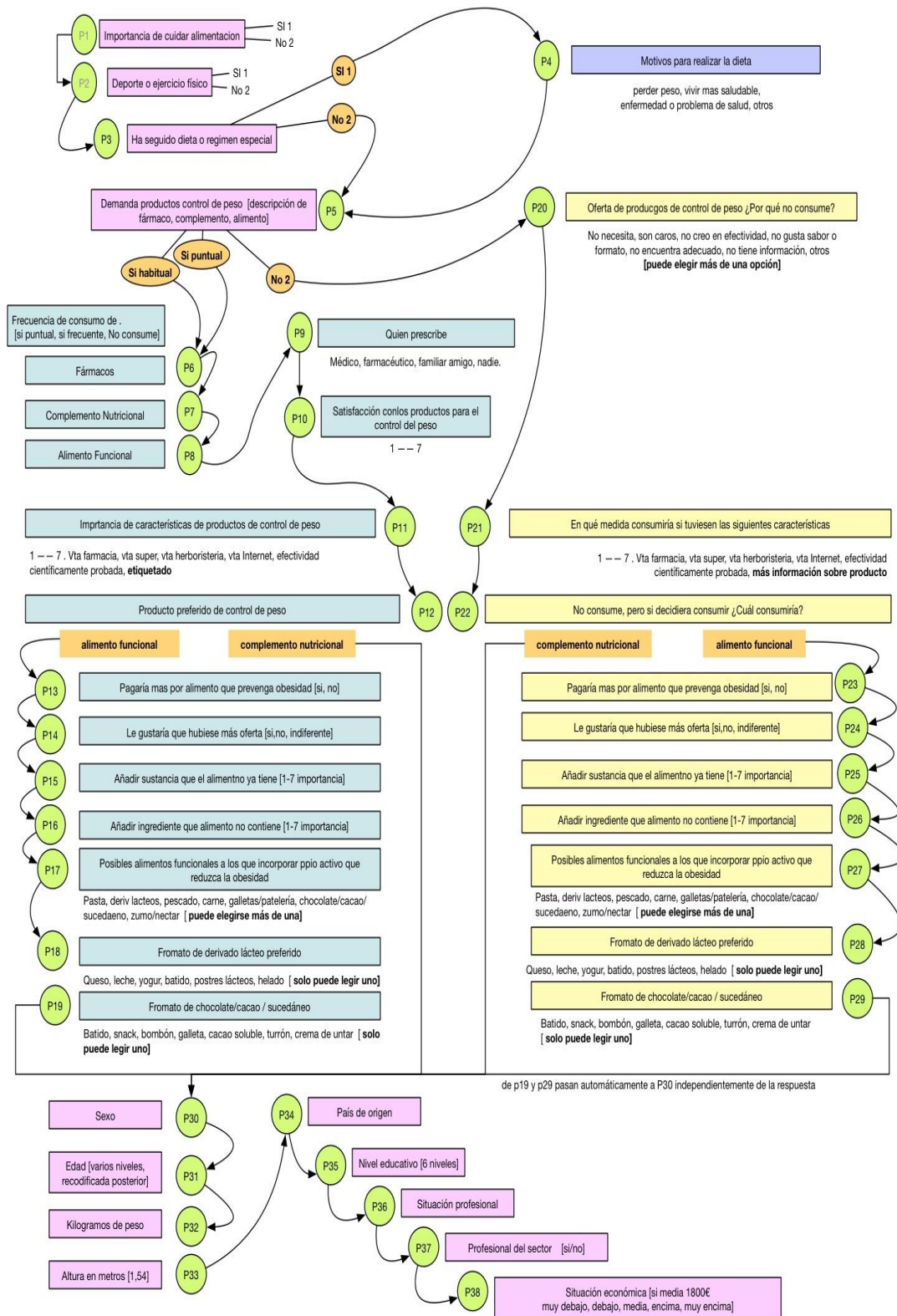


Figura 35. Estructura de la encuesta planteada para la investigación de marketing.





# Resultados y Discusión

## (Primera parte)



## 1. Descripción sociodemográfica de la muestra

Considerando las variables sociodemográficas solicitadas en la encuesta se llevó a cabo una primera caracterización de la muestra analizada. La Tabla 15 ilustra las características de los sujetos, analizando cada una de las variables de manera independiente.

**Tabla 15.** Características sociodemográficas de la muestra.

	Distribución porcentual	%
<b>Sexo</b>	Hombre	41,3
	Mujer	58,7
<b>Edad</b>	<30 años	12,0
	30-50 años	63,5
	>50 años	24,5
<b>Situación profesional</b>	Trabajando por cuenta propia	15,4
	Trabajando por cuenta ajena	75,5
	Labores del hogar	1,4
	En desempleo	4,8
	Jubilado/a o prejubilado/a	2,9
<b>Profesional del sector de la Alimentación y Nutrición</b>	Si	23,6
	No	76,4
<b>Ingresos</b>	Por debajo de la media	18,8
	En la media (1800€/mensuales)	29,8
	Por encima de la media	51,4
<b>Formación</b>	Estudios Básicos/Primaria	1,0
	Estudios Secundarios	8,6
	Estudios Universitarios	90,4

Como puede concluirse de la Tabla 15, los datos muestran un equilibrio de la muestra por sexos, así como por la integración de diferentes tramos de edad, si bien las personas encuestadas tenían mayoritariamente entre 30 y 50 años. Respecto a la situación profesional, 75,5% de los participantes trabajan por cuenta ajena y 15,4% por cuenta propia, de forma que el 87% de la muestra se puede considerar laboralmente activa. Dado que la encuesta también se envió a diferentes asociaciones de Nutrición y Dietética, un 23,6% de la muestra analizada son profesionales relacionados con este ámbito. Finalmente, los individuos afirman contar con unos ingresos en torno a la media o superiores en más de un 80% de los casos y su grado de formación es

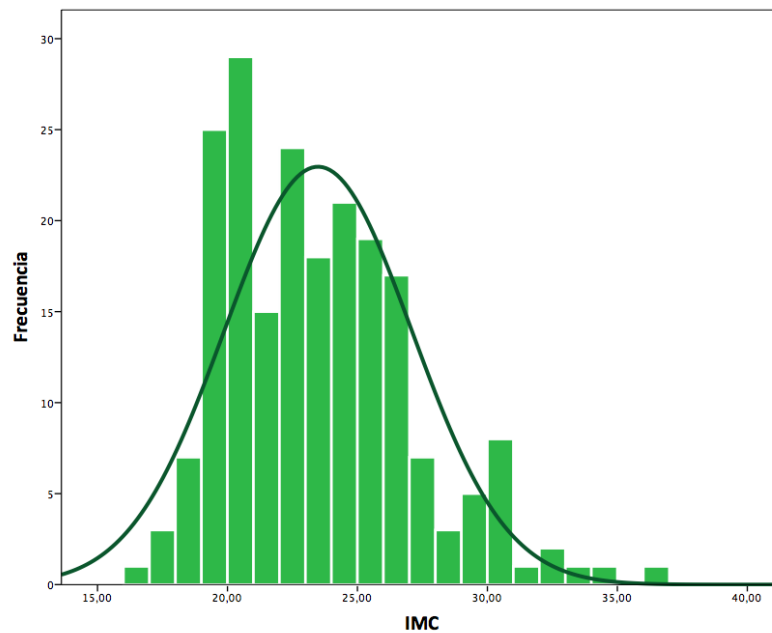
fundamentalmente de estudios universitarios en un 90% de los casos.

## 2. Distribución del Índice de Masa Corporal (IMC)

Dado el interés que representa el indicador de masa corporal en los objetivos de la investigación como indicador de sobrepeso y obesidad, se realizó un breve análisis para determinar la distribución de esta variable en la muestra. Según los datos derivados de la encuesta, un 68,8 % de los encuestados tiene un IMC por debajo de 25, mientras que el 31,2% presenta algún tipo de sobrepeso u obesidad (Tabla 16 y Figura 36).

**Tabla 16.** Distribución porcentual de la muestra en función del IMC

IMC	%
< 25	68,8%
Entre 25 y 30	24,5%
> 30	6,7%



**Figura 36.** Distribución del IMC para los componentes de la muestra.

Como se deduce de esta Figura, la media para la muestra analizada es de 23,48, siendo la mediana de 22,98. Tal y como indica la Tabla 16, el 24,5% de los encuestados mostraron indicios de sobrepeso, si bien solamente un 6,7% podrían considerarse como casos de obesidad. La distribución tiene un comportamiento leptocúrtico (Curtosis= 0,567), mostrando una distribución especialmente concentrada en torno a la media respecto de una distribución normal, así como una orientación asimétrica hacia la derecha (Asimetría 0,793) indicando mayor propensión de los casos a ubicarse en valores superiores a la media.

Con el objetivo de relacionar las principales variables sociodemográficas con la dimensión de potencial sobrepeso, se llevó a cabo un análisis de tablas de contingencia entre los valores del IMC en relación a aspectos como la edad, el sexo y la renta.

En primer lugar, la Tabla 17 muestra la distribución de los grupos de edad en función del IMC, considerando esta última variable como una variable dicotómica en la que los valores por encima de 25 se consideran como indicador de sobrepeso.

**Tabla 17.** Tabla de tabulación cruzada entre edad (3 niveles) e IMC (2 niveles).

	Edad			Total
	<30	30-50	>50	
IMC<25	92,0%	75,0%	42,2%	68,8%
IMC>25	8,0%	25,0%	58,8%	31,2%
<b>Total</b>	<b>12,0%</b>	<b>63,5%</b>	<b>24,5%</b>	<b>100,0%</b>

$\chi^2=26,74$ ; Sig=0,000

Analizando los grupos con un IMC menor de 25 y mayor de 25, puede verse como el 68,8% de la muestra no presenta sobrepeso ni obesidad, pero este porcentaje no se distribuye de manera equitativa entre los diferentes tramos de edad. Puede verse claramente como fundamentalmente se encuentra en sujetos menores de 30 (92%), entre 30 y 50 se distribuye de forma parecida a la población (75%) y por encima de 50 el porcentaje se reduce (42,2%). La situación inversa se da para el caso de los sujetos con IMC superior a 25, localizándose fundamentalmente en tramos de edad de 30-50 (25%), pero sobre todo de 50 en adelante (58,8%). Los resultados muestran, por tanto una relación positiva entre la edad y la propensión a sufrir situaciones de sobrepeso y obesidad.

En segundo lugar, se llevó a cabo este mismo análisis para estudiar la relación entre el sexo y el IMC (Tabla 18).

**Tabla 18.** Tabla de tabulación cruzada entre sexo (2 niveles) e IMC (2 niveles).

	Sexo		Total
	Hombre	Mujer	
IMC<25	40,7%	88,5%	68,8%
IMC>25	59,3%	11,5%	31,2%
<b>Total</b>	<b>41,3%</b>	<b>58,7%</b>	<b>100,0%</b>

$\chi^2=53,71$ ; Sig=0,000

En este caso, el análisis multivariable muestra que los hombres tienen IMC claramente superior al de las mujeres. El porcentaje de hombres con IMC>25 está muy por encima de la “media de la población total con IMC>25” (Figura 37). Para el tramo de edad entre 30 y 50 años, hay mayor dispersión en el valor de IMC tanto en hombres (desde 22 a 35) como en mujeres (desde 17 a 32). Para el caso de los encuestados menores de 30 años, en ningún caso se ha registrado obesidad. Para los participantes mayores de 50 años, se observaron diferencias en los valores de IMC tanto en hombres (desde 24 a 33) como en mujeres (desde 20 a 32).

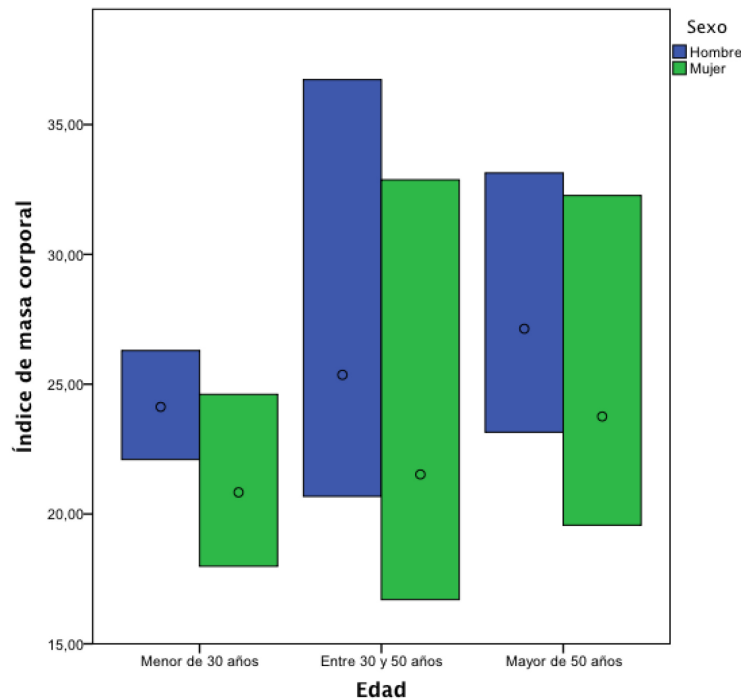


Figura 37. Representación del IMC en hombres y mujeres por edades.

En tercer lugar, en relación a la renta, se observó que las personas con un IMC<25 tenían mayoritariamente una renta por debajo de la media mientras que en las personas con IMC>25 su renta solía estar por encima de la media (Tabla 19).

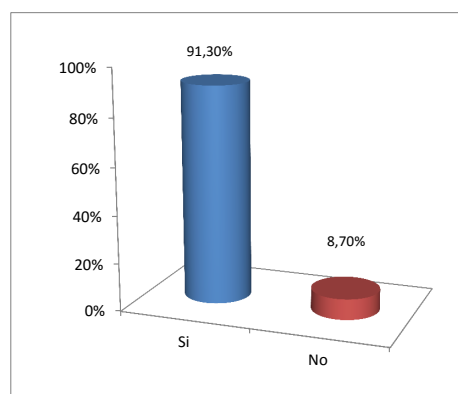
Tabla 19. Tabla de tabulación cruzada entre la renta (3 niveles) e IMC (2 niveles).

	Renta			Total
	Debajo de la media	En la media	Encima de la media	
IMC<25	94,9%	74,0%	57,9%	68,8%
IMC>25	5,1%	29,0%	42,1%	31,2%
<b>Total</b>				
$\chi^2=18,34;$ Sig=0,000	18,8%	29,8%	51,4%	100%

Finalmente, se consideró la relación entre el hecho de ser o no profesional de la salud, la situación laboral y el grado de formación con el IMC. En ninguno de los casos se detectaron relaciones estadísticamente significativas. En primer lugar, se muestra una asociación positiva entre el hecho de pertenecer al colectivo de profesional relacionado con la alimentación y la nutrición y la ausencia de sobrepeso, si bien no puede afirmarse de forma estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 2,31$ ; Sig.= 0,128). En segundo lugar, aquellos laboralmente inactivos muestran una mayor tendencia al sobrepeso si bien, de nuevo, esta relación no se muestra estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 0,11$ ; Sig.= 0,739). Finalmente, no se ha encontrado relación entre la formación y el IMC. Tanto en este último caso, como en el caso de la situación laboral, es preciso matizar que tanto los laboralmente inactivos como aquellos que no tienen formación universitaria conforman un porcentaje bajo de la muestra por lo que esta ausencia de efecto podría deberse a esta contingencia.

### 3. Análisis de los hábitos de los encuestados

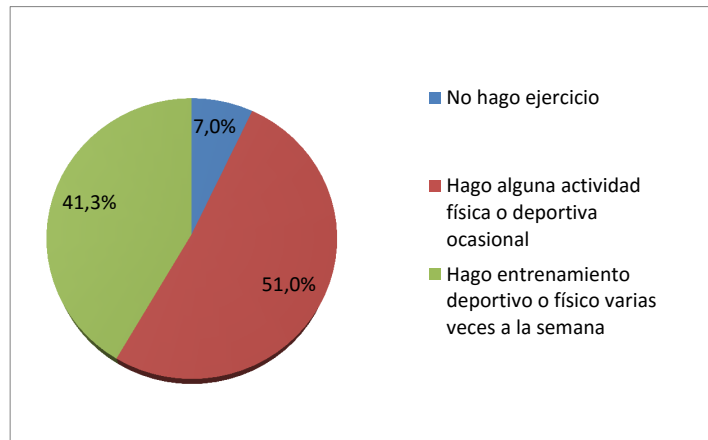
Una vez considerados los aspectos sociodemográficos y la relación de algunas de estas dimensiones con el IMC, se llevó a cabo un sucinto análisis descriptivo de algunos de los hábitos relevantes para los objetivos de nuestra investigación. Al margen de la predisposición genética, los aspectos ambientales relacionados con la correcta alimentación y el ejercicio físico juegan un papel importante en las estrategias de control de peso. En este sentido, se planteó a los encuestados una serie de preguntas relacionadas con la importancia de la alimentación, la actividad física o la realización de algún tipo de dieta alimenticia y sus razones (Figuras 38, 39 y 40).



**Figura 38.** Importancia de la alimentación en los sujetos de estudio.

El 91,3% de los encuestados confirman la importancia que tiene la alimentación en sus estilos de vida siendo, además, un resultado generalizado que no muestra diferencias significativas claras hacia ningún colectivo sociodemográfico. Únicamente, parece existir cierta tendencia hacia una mayor preocupación a medida que se es más joven, con mayor formación o si se trata de profesionales relacionados con la nutrición.

La Figura 39 muestra el comportamiento de la muestra objeto de estudio respecto a la actividad física.

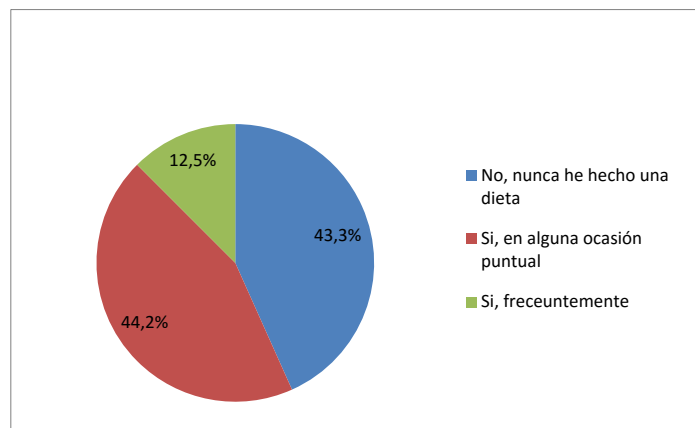


**Figura 39.** Hábitos en relación con el ejercicio físico en los sujetos de estudio.

Al igual que la variable anterior, la gran mayoría de la población analizada realiza alguna actividad física. Si agrupamos aquellos individuos que realizan actividad física de manera ocasional (51%) con los que no realizan ejercicio (7,7%), podemos decir que un 58,7% no realiza ejercicio o lo realiza esporádicamente mientras que un 41,3% de los encuestados realiza ejercicio varias veces a la semana.

Diferenciando aquellos individuos que practican ejercicio regularmente y los que no hacen o lo hacen de manera ocasional, podemos afirmar que la distribución es bastante homogénea a lo largo de las diferentes categorías sociodemográficas, no observándose diferencias significativas para colectivos distintos.

La Figura 40 analiza el comportamiento de la muestra respecto a la dieta y al hecho de realizar un régimen especial.



**Figura 40.** Hábitos en relación con realizar dieta o régimen especial en los sujetos de estudio.



En este caso, nos encontramos ante una muestra donde el 43,3% de los sujetos no han hecho nunca dieta y el 56,7% han realizado alguna dieta en algún momento, ya sea de manera puntual (44,2%) o frecuentemente (12,5%). De nuevo, no existen diferencias en cuanto al comportamiento de esta variable para distintos perfiles sociodemográficos, por lo que puede considerarse como un reflejo de hábito generalizado a lo largo de toda la muestra seleccionada.

El análisis de estos tres parámetros nos permite afirmar que estamos ante una muestra con una preocupación por la alimentación, que realiza ejercicio físico y donde más del 50% de los encuestados ha realizado algún tipo de dieta, por lo que podría servir como muestra representativa para el estudio de productos de control de peso (Nielsen., 2015). También destacar que el 90 % de los encuestados ha cursado estudios universitarios, por lo que la muestra analizada podría considerarse válida dado que este parámetro reduce la incidencia de sobrepeso y obesidad, principalmente en jóvenes hasta 25 años (INE., 2012) (Figuras 6 y 7).

Considerando que el principal motivo que indicaron los encuestados, respecto al hecho de realizar dieta, era perder peso o mantener el actual (75,4%), actitud que se refleja principalmente en mujeres entre 5 y 44 años de edad (INE., 2012), es de interés evaluar qué opinión tiene el consumidor acerca de este tipo de productos actualmente disponibles.

#### **4. Comportamientos y actitudes hacia los productos de control de peso**

Una vez analizados los principales aspectos sociodemográficos y físicos de la población y evaluados sus comportamientos básicos relevantes en torno al control de peso, se evaluó el comportamiento del consumidor frente al consumo de productos específicos. Para ello se clasificaron estos productos según se indica a continuación:

FÁRMACO: Producto de prescripción médica que se encuentra generalmente en farmacia.

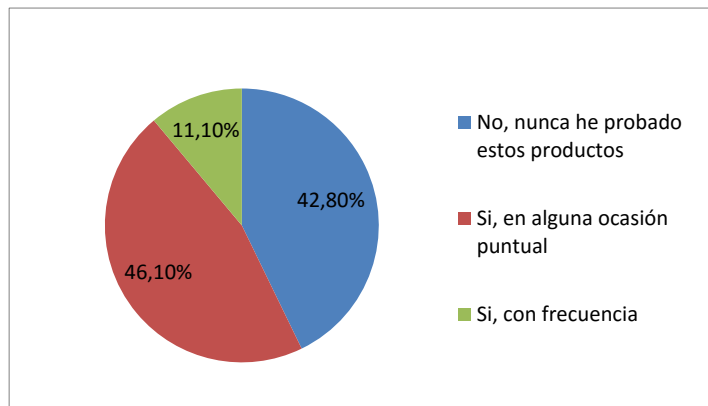
COMPLEMENTO NUTRICIONAL: Es un producto en forma farmacéutica (cápsula, comprimido, tableta, sobre, líquido...) con nutrientes (vitaminas, minerales, aminoácidos...), fotoquímicos o extractos de plantas, cuya finalidad es complementar la alimentación. Generalmente se adquiere en parafarmacias, farmacias, herboristerías, supermercados y/o grandes superficies sin prescripción médica.

ALIMENTO FUNCIONAL: Alimento que, además de cubrir las necesidades nutricionales, ejerce un efecto beneficioso en la salud. Se encuentra generalmente en farmacias, parafarmacias, supermercados o grandes superficies.

El desarrollo del análisis en esta fase de la encuesta se corresponde con los objetivos perseguidos en la investigación, de forma que el punto de partida pasa por clasificar a los encuestados en función de si consumen (grupo A) o no (grupo B), algún tipo de producto de control de peso de los previamente mencionados. En el caso de haber consumido alguno de ellos, se profundizó sobre aspectos relacionados con su consumo como la vía de prescripción de los mismos, el grado de satisfacción de los productos consumidos, y la valoración de determinadas características de los productos en cuanto a su importancia a la hora de elegir unos u otros. A partir de este punto, se consultó a los sujetos si preferían un alimento funcional o un complemento nutricional. Aquellos que preferían un complemento nutricional, pasaron a contestar directamente las preguntas sobre aspectos sociodemográficos mientras que, aquellos que preferían un alimento funcional fueron sometidos a algunas preguntas adicionales. En este sentido, se evaluó si estarían dispuestos a pagar más por un producto de mayor valor añadido, que valoración asignaban a la oferta actual y qué tipo de alimento, producto y formato preferían como alimento funcional.

Por otro lado, para aquellos que no consumían productos de control de peso (grupo B), el interés se dirigió hacia el conocimiento de las causas de su falta de consumo y las características que deberían tener los productos para que la probabilidad de ser consumidos aumentase. De este modo, se generó un paralelismo para valorar la importancia de determinadas características de estos productos para los que los consumen e importancia de estas mismas características para que los no consumidores pasen a ser consumidores. Del mismo modo, se consideraron las preferencias de complemento o alimento funcional para los no consumidores (en caso de que se decidiesen a consumir), pasando a analizar, con más detalle, a aquellos que preferirían alimentos funcionales frente a complementos. En este caso, se realizó el mismo análisis que se realizó para los consumidores de productos, dado que se les preguntó si estarían dispuestos a pagar más por un producto de mayor valor añadido, si les gustaría que hubiese más oferta, qué opciones les parecían más adecuadas para la elaboración del alimento funcional, o las preferencias de productos y formatos (Figura 34).

Para facilitar la comprensión de los tres conceptos de producto de control de peso planteados al encuestado (alimento funcional, complemento nutricional o fármaco), cada una de las definiciones anteriores fue acompañada, en la encuesta, con imágenes ilustrativas de cada producto (Anexo 1). A continuación, se preguntó al encuestado si había consumido alguno de estos productos independientemente de su formato y tipología. La Figura 41 recoge los resultados obtenidos para toda la muestra analizada.



**Figura 41.** Consumo de productos de control de peso corporal.

Se observa que el 42,8 % de la muestra nunca ha probado este tipo de productos y un 57,2% los ha probado en alguna ocasión, diferenciando aquellos que lo han probado en alguna ocasión puntual (46,6%) de los que los toman con frecuencia (11,8%).

Con el fin de determinar los perfiles de los consumidores o no consumidores de estos productos, cruzamos el consumo con las variables demográficas básicas (Tabla 20).

**Tabla 20.** Relación entre el consumo de productos de control de peso y las variables demográficas.

		Consumo productos control de peso		Total
		Si	No	
sexo	Mujer	66,4%	48,3%	58,7%
	Hombre	33,6%	51,7%	41,3%
Edad	<30	12,6%	11,2%	12,0%
	30-50	66,4%	59,6%	63,5%
	>50	21,1%	29,2%	24,5%
IMC	<25	66,4%	71,9%	68,8%
	>25	33,6%	28,1%	31,2%

Los resultados mostraron, de manera estadísticamente significativa que los productos de control de peso son consumidos mayoritariamente por mujeres. Respecto a la edad no se detectaron diferencias significativas para distintos grupos de edad. Del mismo modo, aunque existe una ligera tendencia a un mayor consumo para personas con sobrepeso, esta relación no es estadísticamente significativa, lo que indica que el consumo de estos productos es, en la mayoría de los casos, preventivo. Ni la renta, ni la situación laboral ni la práctica o no de actividad deportiva aparecen significativamente asociadas con el consumo o no de productos.

A partir de este análisis general, tal y como planteamos con anterioridad, se categorizó a los encuestados en dos grandes grupos. Por un lado, aquellos que han tenido experiencias de consumo previas con productos de control de peso (grupo A) y, por otro, a aquellos que nunca han consumido este tipo de productos (grupo B).

#### 4.1. Consumidores de productos de control de peso (grupo A).

Del total de los 208 encuestados, 119 habían consumido productos de control de peso en alguna ocasión. Así, el primer objetivo que nos planteamos para el grupo de los consumidores era identificar qué tipo de producto habían consumido. La Tabla 21 resume los resultados obtenidos.

**Tabla 21.** Preferencia de consumo de productos de control de peso corporal (n=número de encuestados).

	Fármacos		Complementos Nutricionales		Alimentos funcionales	
	n	%	n	%	n	%
No consumo	107	89,9	59	49,6	49	41,2
Consumo puntual	12	10,1	51	42,9	55	46,2
Consumo con frecuencia	-	-	9	7,6	15	12,6
<b>Total</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>119</b>	<b>100</b>	<b>119</b>	<b>100</b>

Los productos más consumidos son los alimentos funcionales (58,8%) seguidos de los complementos nutricionales (50,5%), y finalmente los fármacos (10,1%).

Para entender la relación de las variables demográficas con los diferentes tipos de productos se cruzaron las variables sexo, la edad y el IMC de estos 3 productos (Tablas 22, 23 y 24), aunque se realizaron también cruces con las variables relacionadas con la dieta, la renta y la práctica de deporte o actividad laboral.

Respecto al consumo de medicamentos, al margen de volver a destacar que su consumo es residual, las pautas de comportamiento son homogéneas para todos los perfiles sociodemográficos a excepción del sexo, dado que la totalidad de personas que afirman haber consumido medicamentos con el objetivo de controlar su peso son mujeres. El resto de factores no muestran una relación significativa (Tabla 22).

Tabla 22. Relación consumo de medicamentos y características demográficas.

		Consumo medicamentos		Total
		Si	No	
$\chi^2=6,76$ ; Sig=0,009	Mujer	100,0%	62,6%	66,4%
	Hombre	-	37,4%	33,6%
$\chi^2=1,61$ ; Sig=0,205	<30	-	14,0%	12,6%
	30-50	75,0%	65,4%	66,4%
	>50	25,0%	20,6%	21,0%
$\chi^2=1,93$ ; Sig=0,380	<25	50,0%	68,2%	64,4%
	>25	50,0%	31,8%	33,6%

Tabla 23. Relación consumo de complementos nutricionales y características demográficas.

		Consumo complementos nutricionales		Total
		Si	No	
$\chi^2=2,61$ ; Sig=0,106	Mujer	73,3%	59,3%	66,4%
	Hombre	26,7%	40,7%	33,6%
$\chi^2=0,11$ ; Sig=0,946	<30	13,3%	11,9%	12,6%
	30-50	65,0%	67,8%	66,4%
	>50	21,7%	20,3%	21,0%
$\chi^2=0,104$ ; Sig=0,747	<25	65,0%	67,8%	64,4%
	>25	35,0%	32,2%	33,6%

Tabla 24. Relación consumo de alimentos funcionales y características demográficas.

		Consumo alimentos funcionales		total
		Si	No	
$\chi^2=4,75$ ; Sig=0,029	Mujer	74,30%	55,1%	66,4%
	Hombre	25,70%	44,9%	33,6%
$\chi^2=0,216$ ; Sig=0,898	<30	11,40%	14,3%	12,6%
	30-50	67,10%	65,3%	66,4%
	>50	21,40%	20,4%	21,0%
$\chi^2=0,044$ ; Sig=0,835	<25	67,10%	65,3%	64,4%
	>25	32,90%	34,7%	33,6%

Estos resultados concuerdan con los que se recogen en la literatura científica donde diversos autores han analizado el perfil de consumidor de este tipo de productos (Childs NM., 1997) (Tabla 25), llegando a la conclusión que mayoritariamente las mujeres y con un nivel educativo considerable y de edad avanzada (Verbeke W, 2006) que pueden tener algún tipo de problema en la salud son las mayores consumidoras (Childs NM., 2007; Manyard LJ et al., 2003).

**Tabla 25.** Consumidores de alimento funcionales en USA y Europa en función de diferentes parámetros sociodemográficos.

Edad	Sexo	Educación/ingresos	Referencia
USA			
35-55	Mujer	Educación superior/ ingresos altos	Childs NM., 1997
56-60	Mujer	Educación superior/ ingresos altos	Teratanavat R et al., 2006
45-74	Mujer	Graduado en la Universidad	IFIC., 1999
55+	Mujer	Graduado en la Universidad	Gilbert L., 1997
EUROPA			
55+	Mujer	Baja educación	Poulsen JB., 1999
55+	Mujer	Alta clase socio/económica	Hilliam M., 1996
		Alta educación/ Alto salario	Anttolainen M et al., 2001

Con el fin de observar el grado de complementariedad de estas categorías de productos y analizar en qué medida estos dos tipos de productos son consumidos o no por los mismos encuestados, se realizaron cruces de variables (Tablas 26, 27 y 28).

**Tabla 26.** Tabulación cruzada entre alimentos funcionales y complementos nutricionales.

		Alimentos funcionales		
		Sí	No	Total
Complemento nutricional $\chi^2=0,307$ ; Sig=0,087	Sí	57,10%	40,80%	50,40%
	No	42,90%	59,20%	49,60%

Los resultados de la Tabla 27 muestran que existe cierta relación en el consumo simultáneo de complementos y alimentos funcionales.

**Tabla 27.** Tabulación cruzada entre alimentos funcionales y medicamentos.

		Alimentos funcionales		
		Sí	No	Total
Medicamento $\chi^2=9,34$ ; Sig=0,002	Sí	17,10%	---	10,10%
	No	82,90%	100,00%	89,90%

**Tabla 28.** Tabulación cruzada entre complementos nutricionales y medicamentos.

		Complementos nutricionales		
		Sí	No	Total
Medicamento $\chi^2=3,20$ ; Sig=0,073	Sí	15,00%	5,00%	10,10%
	No	85,00%	95,90%	89,90%

En todos los casos se muestra una relación estadísticamente significativa lo que se traduce en que el consumidor de productos de control de peso generalmente ha probado toda la oferta disponible, pasando por los diferentes formatos actualmente en el mercado, y por lo tanto no es selectivo ni hay una preferencia de compra clara.

A este grupo de consumidores se les formuló una pregunta para averiguar quién había prescrito o recomendado estos productos para control de peso (Tabla 29).

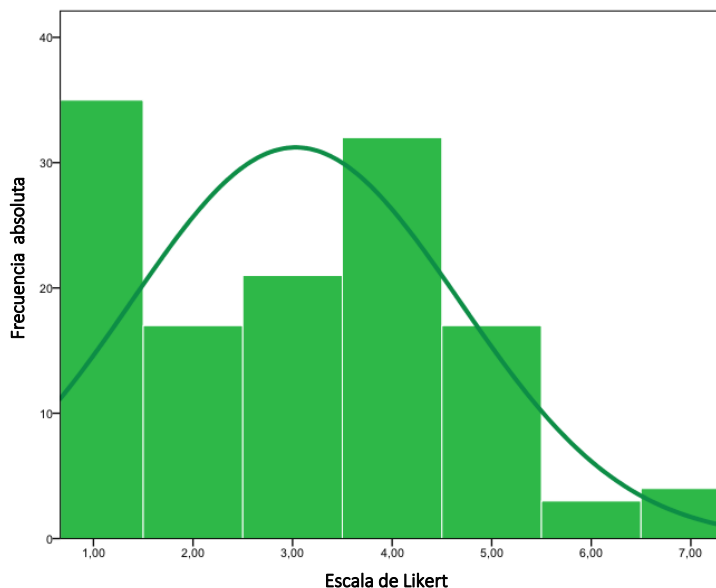
**Tabla 29.** Responsable de la prescripción o recomendación de los productos de control de peso.

	Total
Médico	10,1%
Farmacéutico o profesional sanitario no médico	11,8%
Familiar	2,5%
Amigo	7,6%
Nadie	68,1%
Total	100,0%

Según muestra la Tabla 29, en un 21,9% de los casos la prescripción fue de un médico o profesional reconocido, en un 10,1% el producto fue recomendado por un familiar o amigo y en un 68,1% de los casos, nadie recomendó el producto. Recodificando la variable a estos tres niveles, se puede observar como en el caso de los medicamentos, los que afirman haberlos consumido (n=12), la mitad fueron prescritos por un

profesional. En el caso de los complementos nutricionales, dentro de los consumidores de estos productos (n=60) mayoritariamente fue un farmacéutico o profesional sanitario no médico (33,3%) quien lo recomendó, frente al 13,3% de familiares o amigos, mientras que la compra sin recomendación supone el 53,3% de los casos. Finalmente, en el caso de los consumidores de alimentos funcionales (n=70), la prescripción profesional pierde importancia, bajando a un 24,3%. Un 10% afirman haber solicitado la recomendación de amigos o familiares aunque, mayoritariamente, se da una situación de ausencia de prescripción. En cualquier caso, hay que tomar con precaución estos resultados, pues los individuos pueden haber elegido más de un producto y la recomendación se refiere al último producto adquirido. En este sentido, la única reflexión relevante que se desprende es la previsible importancia de la ausencia de recomendación en el caso de los alimentos funcionales frente a las otras categorías, donde la presencia de la recomendación del profesional, ya sea personal médico o no, es mayor.

Seguidamente se evaluó la opinión de los consumidores sobre las características de los productos de control de peso. En primer lugar se evaluó el grado de satisfacción del último producto que habían probado haciendo a los encuestados que valoraran del 1 al 7 en una escala de Likert, siendo 1 “en absoluto satisfecho” y 7 “muy satisfecho” (Figura 42).



**Figura 42.** Satisfacción de los consumidores con el último producto consumido.

En este caso, la media resultante es de 2,96, aunque un 27,1% de la muestra se mostró absolutamente insatisfecha con el último producto de control de peso consumido. El porcentaje de insatisfacción alcanza el 58,8% (valores inferiores a 3 en la escala de Likert) y el 84% de los encuestados muestran puntuaciones de 4 o inferiores, por lo que



en general, puede inferirse una situación de insatisfacción más o menos generalizada para los consumidores de este tipo de productos.

De igual modo que en los casos anteriores, se hicieron cruces de variables según los datos sociodemográficos (Tabla 30).

**Tabla 30.** Grado de satisfacción de los consumidores de productos de control de peso.

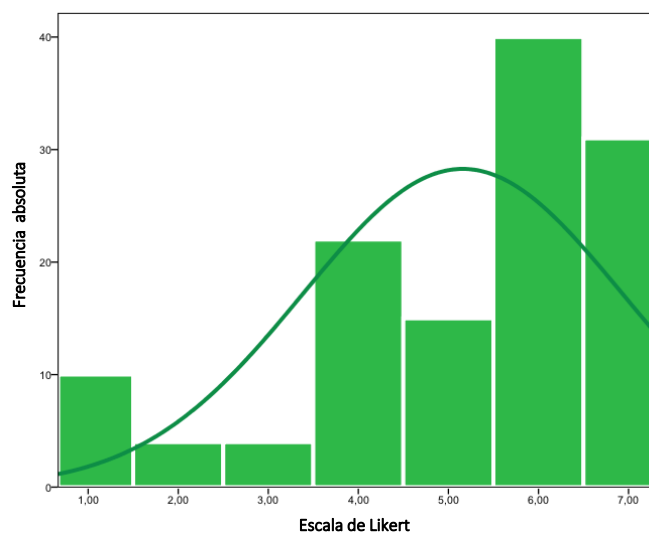
		Escala de Likert
<b>Sexo</b>	Hombre	2,8
	Mujer	3,0
<b>Edad</b>	<30 años	2,7
	30-50 años	3,1
	>50 años	2,6
<b>IMC</b>	< 25	3,1
	> 25	2,7
<b>Renta</b>	Por debajo de la media	2,9
	En la media	2,9
	Por encima de la media	3,0

Como puede observarse, la mujer entre 30 y 50 años con IMC<25 y con una renta por encima de la media ha puntuado con un mayor valor en la escala de Likert el grado de satisfacción de estos productos pese a que en ningún caso se llega a sobrepasar el valor de 3. Aquellos con un IMC > 25 están muy poco satisfechos con estos productos y a nivel estadístico, no se observaron diferencias significativas entre la satisfacción media de hombres y mujeres (F: 0,596; p=0,442). Del mismo modo, las diferencias por edades tampoco se muestran significativas (F: 1,344; p=0,265). Tampoco se muestra una relación clara entre el IMC del sujeto y la satisfacción con los productos de control de peso consumidos (F: 1,603; p=0,208), así como diferencias debidas a la renta (F:0,026; p=0,974). El resto de variables consideradas (i.e. dieta, profesional o no o práctica de deporte) tampoco mostraron una relación significativa.

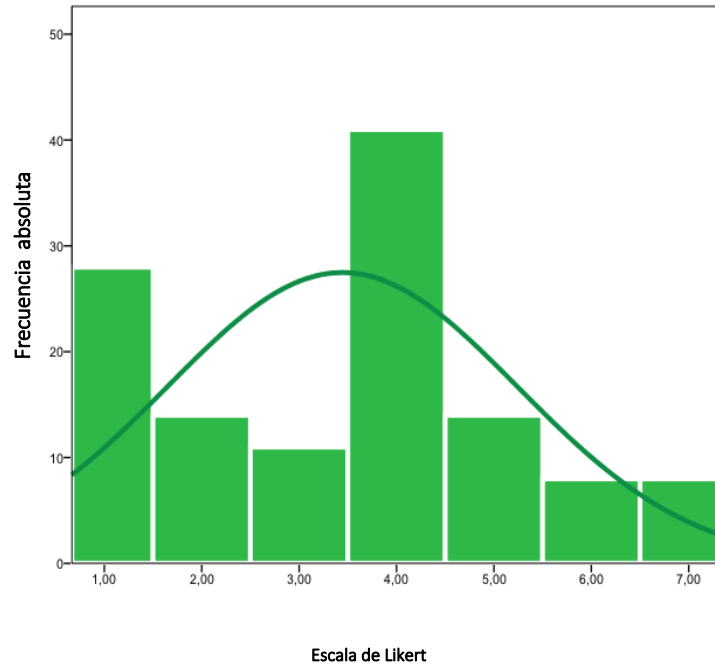
A continuación se analizaron ciertas características de los productos de control de peso. Concretamente se determinó, por Likert, la importancia del canal de distribución, distinguiendo entre la venta en farmacias, supermercados, herboristerías o centros de estética y por internet (Figuras 43, 44, 45 y 46). La Tabla 31 resume los valores medios de la importancia asignada a cada factor.

**Tabla 31.** Importancia que el consumidor asigna a algunas características de los productos de control de peso.

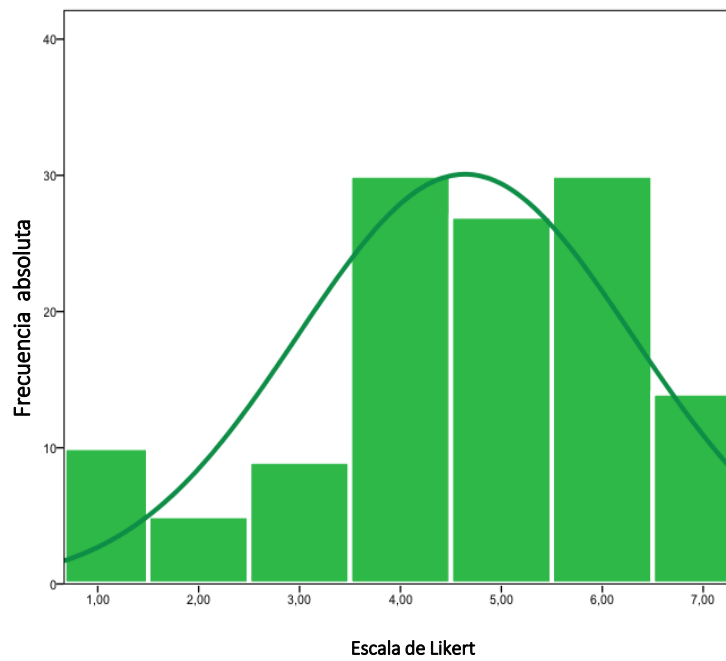
Factor considerado	Escala de Likert
Que tenga efectividad científicamente demostrada	6,4
Que el producto tenga un buen etiquetado	5,6
Que se venda en farmacias	5,2
Que se venda en herboristerías o centros de dietética	4,6
Que se venda en supermercados	3,5
Que se venda en Internet	2,6



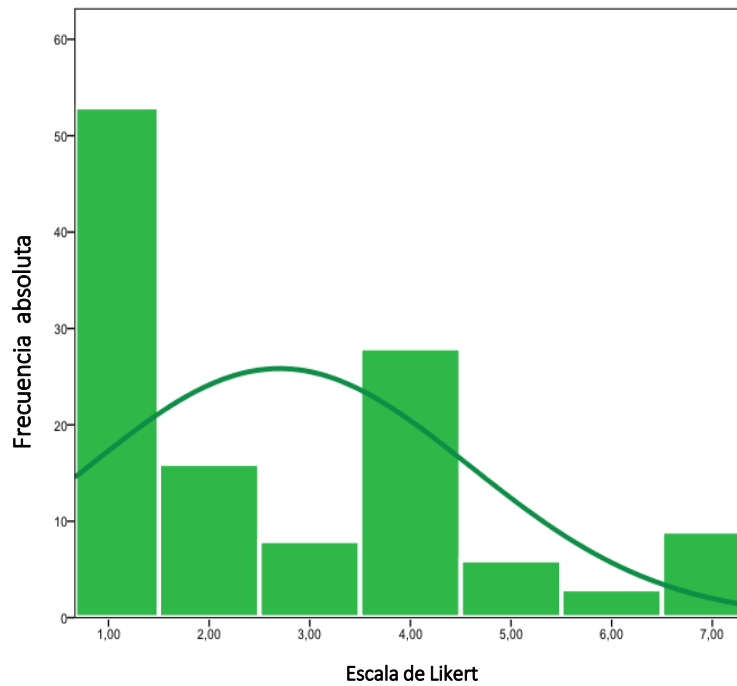
**Figura 43.** Importancia, según la escala de Likert, de que el producto se venda en farmacias.



**Figura 44.** Importancia, según la escala de Likert, de que el producto se venda en supermercados.

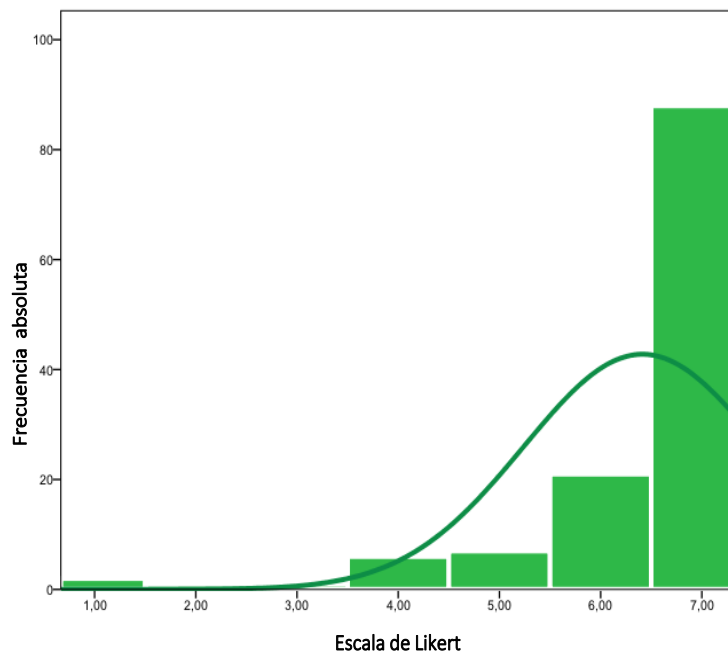


**Figura 45.** Importancia, según la escala de Likert, de que el producto se venda en herboristerías o centros de dietética.

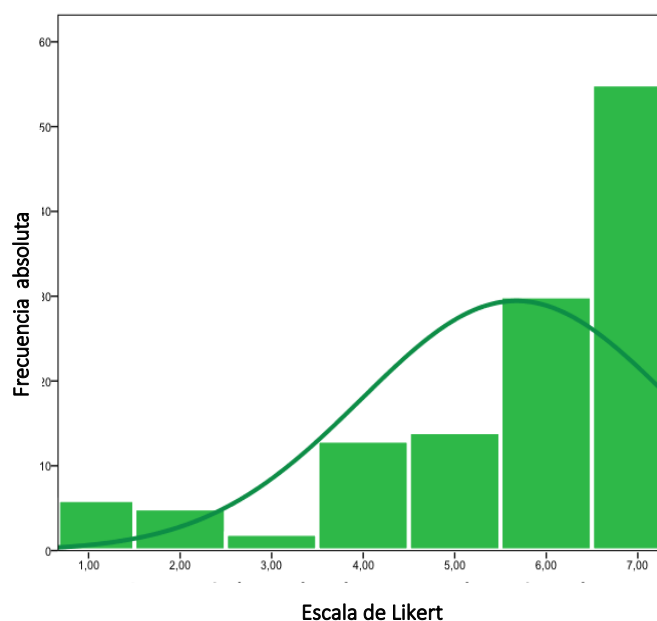


**Figura 46.** Importancia, según la escala de Likert, de que el producto se venda por internet.

También se evaluó la importancia que tenía para los consumidores el hecho de que el producto tuviera una efectividad científicamente demostrada y un buen etiquetado (Figuras 47 y 48).



**Figura 47.** Importancia, según la escala de Likert, de que el producto tenga una efectividad científicamente demostrada.



**Figura 48.** Importancia, según la escala de Likert, de que el producto tenga un buen etiquetado.

En base a los resultados anteriores, es importante destacar que los factores más valorados están relacionados directamente con las funcionalidades del producto y no tanto con el canal por el que se comercialice. De los criterios planteados, el más importante es que tenga una efectividad científicamente probada, característica que depende, no sólo de los estudios que respalden el efecto funcional del producto, sino también de la capacidad del fabricante de transmitir y comunicar esa eficacia para que el consumidor la perciba correctamente. Respecto al etiquetado, se considera un elemento importante en el proceso de decisión de compra. Respecto al punto de venta, existe una valoración más positiva de establecimientos especializados (fundamentalmente farmacias) frente a los establecimientos no especializados como supermercados o, en este caso, el canal de Internet, que muestra la valoración más baja.

Teniendo en cuenta las variables demográficas, se observó que las mujeres valoran más positivamente que los hombres que tenga una efectividad científicamente demostrada (6,64 vs 6,02) ( $F: 8,364, p=0,005$ ) y sobre todo que el producto tenga un buen etiquetado (6,1 vs 4,71) ( $F: 18,779; p= 0,000$ ). A modo de curiosidad se analizó la renta y se observó que existe una relación significativa en la importancia de que se venda por Internet, observándose que a menor renta más importancia tiene este factor, probablemente debido al precio

#### 4.2. No consumidores de productos de control de peso (grupo B)

Dentro de esta categoría de encuestados, en primer lugar se analizaron las causas del no consumo de estos productos y en segundo lugar, qué cambios en la oferta actual serían necesarios para que hubieran más consumidores de productos de control de peso.

Respecto a los motivos del no consumo, los resultados se agrupan en la Tabla 32.

**Tabla 32.** Razones para no consumir productos de control de peso.

Razón para no consumir	% (n=89)
No necesito controlar mi peso	48,3
Creo que tienen un precio elevado	11,2
No creo en la efectividad de estos productos	37,1
No me gusta el sabor y el formato que tienen	2,2
No encuentro productos que se ajusten a mis necesidades	-
No tengo suficiente información sobre estos productos	23,6
Es suficiente con una alimentación sana y equilibrada	14,6

Según los resultados obtenidos, la razón fundamental por la que no se consume este tipo de productos se debe a que los encuestados no consideran que necesiten controlar su peso (48,3%), seguida de la duda sobre la efectividad (37,1%) y la falta de información sobre los productos (23,6%). En este caso, tal y como registra la literatura, hay un alto grado de escepticismo por parte del consumidor que requiere productos innovadores de alta calidad y con evidencia científica que respalde su efectividad (Stewart-Know B et al., 2003) mientras que el precio, el sabor y el formato, aunque también son importantes, pasarían a un segundo plano.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de tabulación cruzada, exclusivamente para aquellos sujetos que afirmaban no consumir productos de este tipo y para cada una de las causas aducidas en función de los diferentes factores sociodemográficos.

Considerando los aspectos más relevantes, no se detecta ninguna relación entre el sexo o la renta con los motivos por los que no se consumen estos productos. En cuanto al IMC, se observa que aquellos con un  $IMC < 25$ , piensan más que no necesitan controlar su peso ( $\chi^2 = 11,16$ ; Sig. = 0,001) y aquellos con un  $IMC > 25$  son los que más dudan sobre su efectividad ( $\chi^2 = 7,83$ ; Sig. = 0,005). En lo que se refiere a la renta, y si consideramos dos niveles (i.e. en la media o por debajo y por encima de la media) se observa una

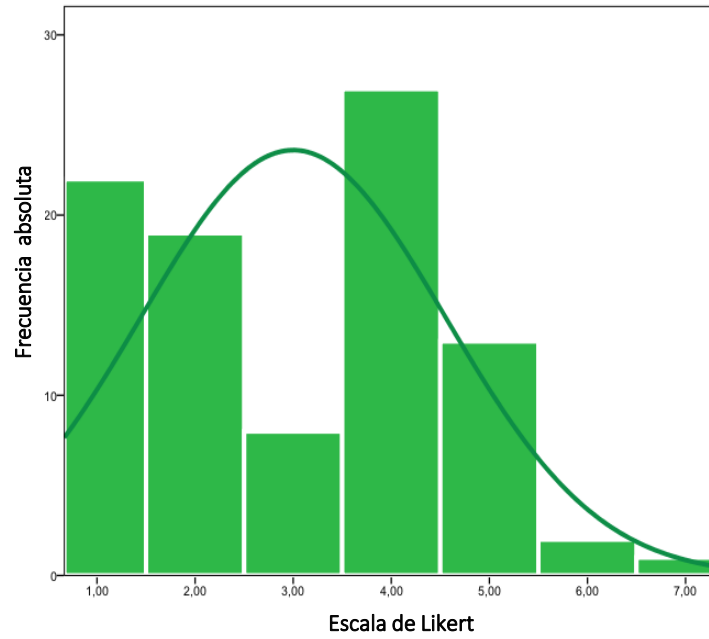
relación significativa entre el motivo del precio elevado con el colectivo que representa una renta media/baja ( $\chi^2= 3,08$ ; Sig.= 0,07). Considerando el factor dieta, aquellos que no han realizado nunca dietas aducen más el motivo de no necesitar este tipo de productos ( $\chi^2= 12,85$ ; Sig.= 0,000) mientras que aquellos que si han realizado dieta en algún momento plantean con más frecuencia las razones relacionadas con las dudas sobre su efectividad ( $\chi^2= 3,01$ ; Sig.= 0,08) y el hecho de que no disponen de información suficiente ( $\chi^2= 4,14$ ; Sig.= 0,042). Finalmente, el resto de factores sociodemográficos analizados (e.g. práctica de deporte activa, situación laboral, formación o profesional o no de la nutrición) no dan lugar a diferencias significativas en cuanto los motivos aducidos para no ser consumidos por aquellos sujetos que no lo hacen.

Respecto a los cambios en la oferta actual, y dado que se trata de no consumidores de este tipo de productos, se plantearon una serie de preguntas que evaluaban en qué medida consumirían estos productos de control de peso si tuviesen una serie de características, tal y como se planteó para el grupo de los consumidores (Tabla 33).

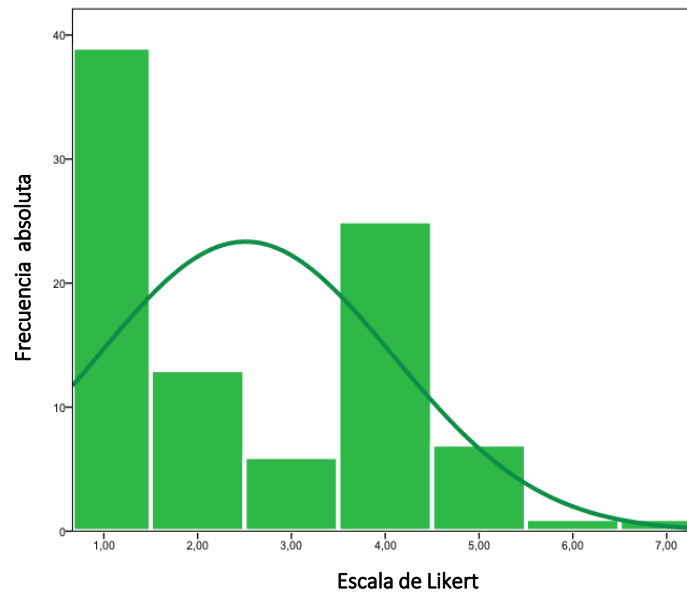
**Tabla 33.** Importancia asignada a factores por parte de los no consumidores.

Factor considerado	Importancia media
Que tuviera una efectividad científicamente demostrada	4,0
Que hubiera más información acerca del producto	3,6
Que se vendiera en farmacias	3,0
Que se vendiera en herboristerías o centros de dietética	2,8
Que se vendiera en supermercados	2,5
Que se vendiera en Internet	2,2

Las Figuras 49, 50, 51, 52, 53 y 54 contienen los resultados para cada variable.

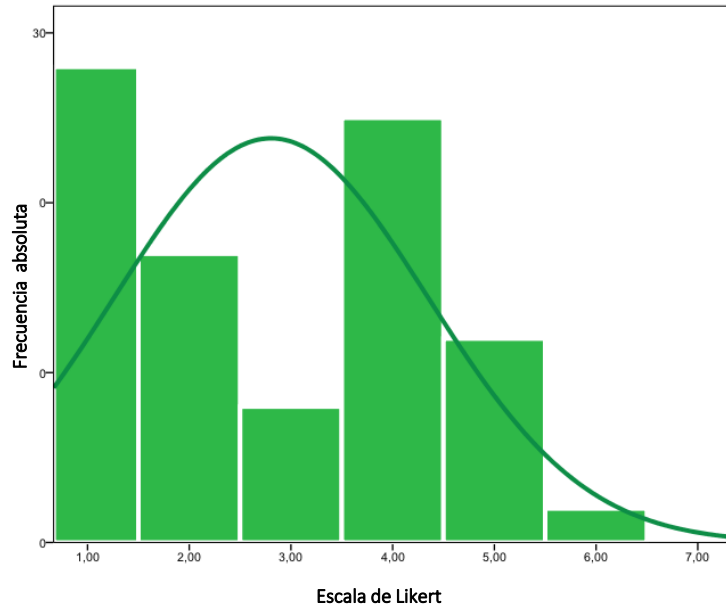


**Figura 49.** Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto se vendiera en farmacias.

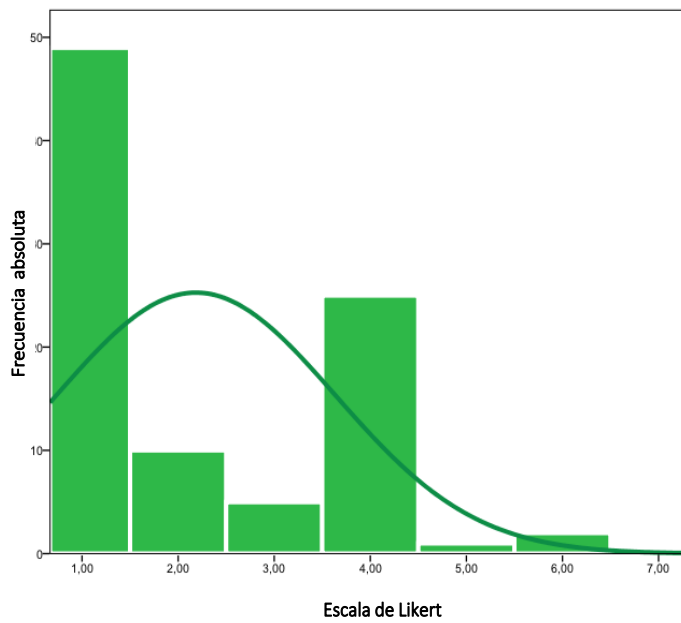


**Figura 50.** Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto se vendiera en supermercados.

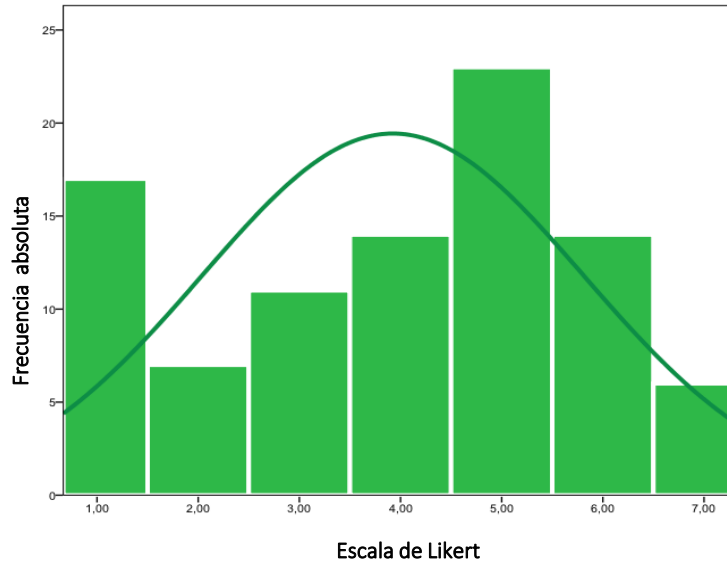




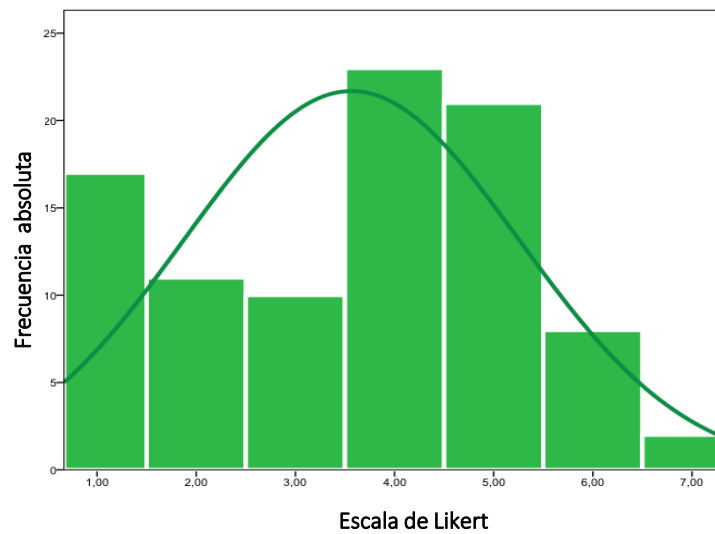
**Figura 51.** Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto se vendiera en herboristerías o centros de dietética.



**Figura 52.** Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto se vendiera por internet.



**Figura 53.** Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que el producto tuviera una efectividad científicamente demostrada.



**Figura 54.** Estudio de la importancia que tendría, según la escala de Likert, que hubiera más información acerca del producto.

Según los resultados obtenidos, las puntuaciones son más bajas, en general, que para los consumidores habituales de este tipo de productos. Las variables más destacadas son la efectividad y el hecho de que se pudiese disponer de más información sobre el producto. En este caso, el canal influye menos, aunque manteniendo la tendencia a una mayor confianza en farmacias, herboristerías y centros de dietética. Los resultados de las comparaciones a través de Análisis de la Varianza, muestran resultados significativos en cuanto a las diferencias en la importancia de los criterios considerados en la elección.

Del análisis de las variables cruzadas se observó, en este caso, que no existen diferencias significativas en las valoraciones medias entre hombres y mujeres. En cuanto a la edad, solo aparecen diferencias respecto a la efectividad, con diferencias claras entre los jóvenes (valoración de 5,1 en escala de Likert), los de edad intermedia (4,05 en escala de Likert) y los de edad avanzada (3,46 en escala de Likert). Respecto a disponer de más información del producto, se obtuvieron medias de 4,2; 3,8; y 3,04 en Likert para los mismos grupos respectivamente ( $F:2,48$   $p=0,089$ ). Del mismo modo, se realizaron comparaciones para el resto de variables sociodemográficas y el IMC, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los sujetos de diferentes categorías.

## 5. Preferencia de producto de control de peso

Una vez analizada la importancia de los factores tanto para consumidores (grupo A) como para no consumidores (grupo B) de este tipo de productos, se analizó qué tipo de producto de control de peso consume o estaría más dispuesto a consumir el encuestado.

A modo general, los resultados mostraron una preferencia por el alimento funcional (83,9%) frente al complemento nutricional (16,1%), sin observarse diferencias significativas entre los consumidores y los no consumidores (Figura 55 y Tabla 34). Esto resulta de gran interés para definir nuevas estrategias en el desarrollo y selección de nuevos ingredientes para el diseño de nuevos alimentos funcionales, cada vez más aceptados por el consumidor (Nielsen., 2015).

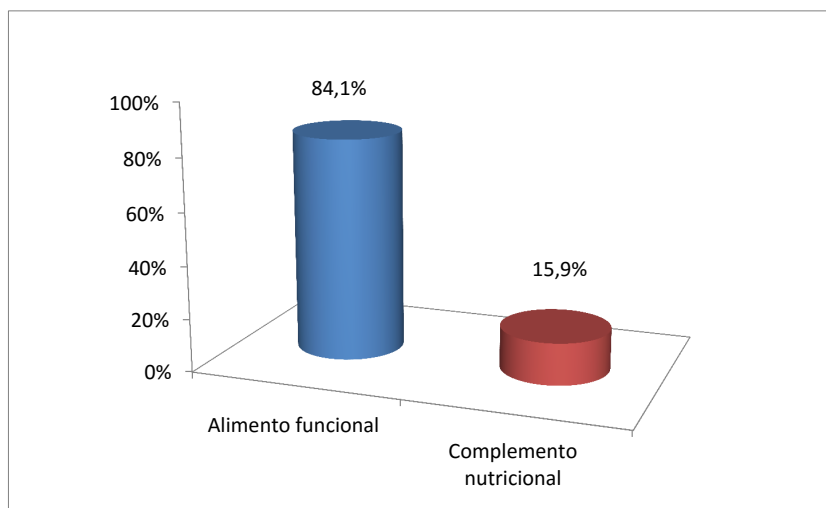


Figura 55. Preferencia de producto de control de peso corporal.

**Tabla 34.** Preferencia de producto para los consumidores y no consumidores.

	PRODUCTOS DE CONTRO DE PESO		
	Consumidor	No consumidor	Total
Alimento funcional	84,0%	84,3%	84,1%
Complemento nutricional	16,0%	15,7%	15,9%
<b>Total</b>	<b>57,8%</b>	<b>42,2%</b>	<b>100,0%</b>
$\chi^2=0,002$ ; Sig=0,963			

A continuación, los encuestados que eligieron como tipo de formato preferido el alimento funcional, fueron sometidos a una serie de preguntas para determinar la importancia de ciertas características de los mismos. En primer lugar se evaluó su disposición a pagar más por un alimento funcional con una evidencia científica (Tabla 35) y si valorarían favorablemente el disponer de una mayor oferta (Tabla 36).

**Tabla 35.** Disposición del consumidor y no consumidor a pagar más por un alimento funcional efectivo.

	PRODUCTOS DE CONTRO DE PESO		
	Consumidor	No consumidor	Total
Pagaría más	78,0%	40,0%	61,7%
No pagaría más	22,0%	60,0%	38,3%
<b>Total</b>	<b>57,2%</b>	<b>42,8%</b>	<b>100,0%</b>
$\chi^2=26,19$ ; Sig=0,000			

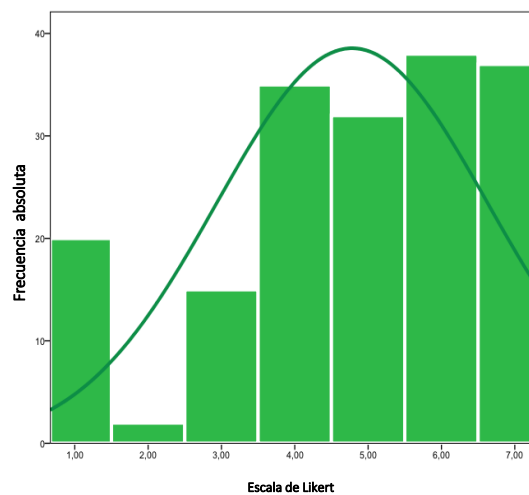
En general, los encuestados estarían dispuestos a pagar más en un 61,7% de los casos, mientras que el 38,3% restante no estaría dispuesto a pagar un precio superior por un alimento funcional. Como se desprende de los datos de la tabla, esta diferencia es mucho más evidente y estadísticamente significativa para no consumidores que para consumidores, de forma que aquellos que ya consumen productos de control de peso son más proclives a considerar un precio superior para los alimentos funcionales.

**Tabla 36.** Análisis de la demanda de mayor oferta de este tipo de productos.

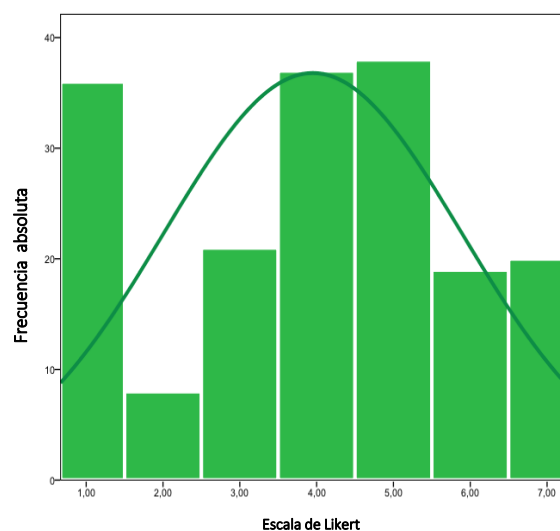
	PRODUCTOS DE CONTRO DE PESO		
	Consumidor	No consumidor	Total
Le gustaría más oferta	54,0%	30,7%	44,0%
No le gustaría más oferta	6,0%	17,3%	10,9%
Indiferente	40,0%	52,0%	45,1%
<b>Total</b>	<b>57,2%</b>	<b>42,8%</b>	<b>100,0%</b>
$\chi^2=11,74$ ; Sig=0,003			

Si consideramos la respuesta al deseo de que hubiese más oferta de este tipo de productos un 44,0% de los individuos afirman que les gustaría disponer de una mayor oferta de productos mientras que el 56% se muestran indiferentes o no les gustaría. Al igual que en el caso anterior, los consumidores de productos de control de peso muestran una predisposición significativamente más favorable hacia la idea de disponer de una mayor oferta de este tipo de productos.

Finalmente se comparó la importancia que tiene, para el consumidor y no consumidor de productos de control de peso, el hecho de que el alimento funcional se haya obtenido por adición de un ingrediente funcional procedente de la misma matriz alimentaria o por la introducción de un ingrediente funcional que provenga de otra matriz, en ambos casos hasta los niveles adecuados para proporcionar un efecto beneficioso (Figuras 56 y 57).



**Figura 56.** Importancia de adicionar un ingrediente funcional procedente de la misma matriz.



**Figura 57.** Importancia de adicionar un ingrediente funcional que provenga de otra matriz.

De las Figuras anteriores, se desprende claramente la preferencia de que la forma de conseguir el alimento funcional pase por añadir una sustancia que provenga de la misma matriz alimentaria frente a la idea de introducir una sustancia proveniente de otra matriz. En el primer caso, la media para todos los encuestados es de 4,8 mientras que en el segundo es de 3,9, observándose una diferencia estadísticamente significativa ( $t=6,03$ ;  $p=0,000$ ).

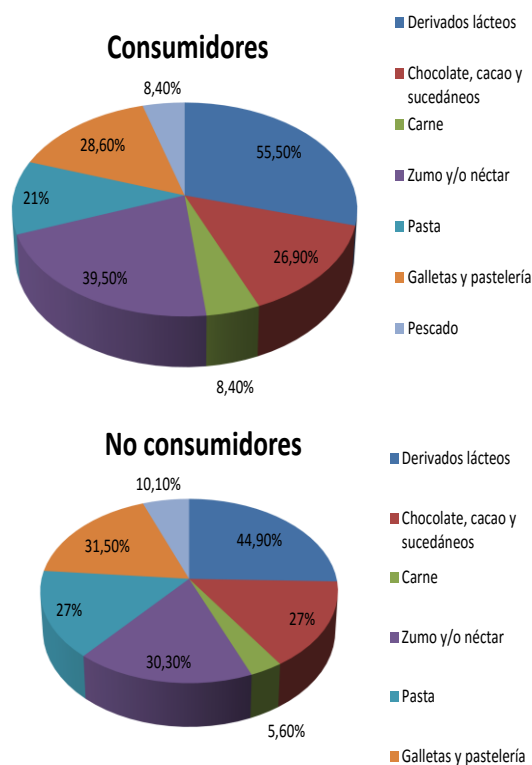
Si consideramos las diferencias para ambas variables entre consumidores y no consumidores, podemos observar como para ambos casos existen diferencias significativas entre unos y otros. En el caso de adición de la sustancia de la misma matriz, la media para los consumidores es de 5,01 mientras que para los no consumidores es de 4,44 ( $F: 4,08$ ;  $\text{sig.}=0,045$ ) mientras que la incorporación de ingredientes proveniente de otra matriz, la media para los no consumidores es de 4,20 y para los consumidores de 3,52 ( $F: 5,42$ ;  $\text{sig.}=0,021$ ).

## 6. Formulación de un alimento funcional

Finalmente, y una vez considerados aspectos generales sobre los alimentos funcionales, se planteó al encuestado qué tipo de producto preferiría consumir y se dieron varias opciones donde poder seleccionar un máximo de tres. Los productos más seleccionados tanto para los consumidores experimentados como los no consumidores se muestran en la Tabla 37 y en la Figura 58.

**Tabla 37.** Preferencia de producto, para el consumidor y no consumidor.

	%		
	Consumidor	No consumidor	Total
Derivados lácteos	55,5%	44,9%	51%
Chocolate, cacao y sucedáneos	26,9%	27%	26,9%
Carne	8,4%	5,6%	7,2%
Zumo y/o néctar	39,5%	30,3%	35,6%
Pasta	21%	27%	23,6%
Galletas y pastelería	28,6%	31,5%	29,8%
Pescado	8,4%	10,1%	9,1%

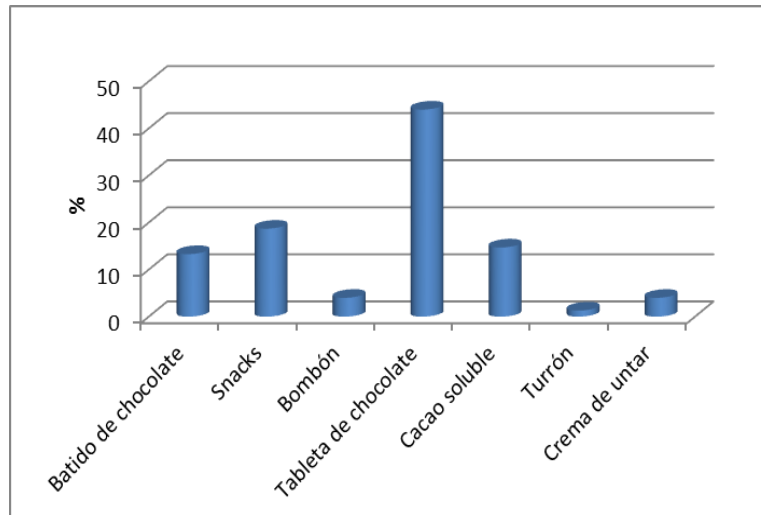


**Figura 58.** Preferencia de producto para el consumidor y no consumidor de productos de control de peso.

De estas gráficas se desprende que, por un lado, respecto a las bebidas, los productos preferidos para la formulación de un alimento funcional son los derivados lácteos, seguidos del zumo y/o néctar. Esto puede deberse a la gran variedad de productos lácteos funcionales actualmente disponibles en el mercado, consecuencia de los diversos estudios en este campo. Recientemente Morell y colaboradores han formulado un yogur a base de proteínas con un efecto saciante (Morell P et al., 2015).

Respecto a los alimentos, las galletas y pastelería y el chocolate, cacao y sucedáneos fueron los productos seleccionados para el posible diseño de un alimento funcional para el control de peso, dejándose en último lugar la pasta, la carne o el pescado. Esta relación es similar tanto para los consumidores como los no consumidores de productos de control de peso.

Teniendo en cuenta que la percepción del consumidor por los productos de chocolate o derivados del cacao está cambiando debido a los recientes estudios que avalan el posible efecto adelgazante del mismo (Cuenca-García M et al., 2014; Farhat G et al., 2014; Latif R., 2013), nos interesó averiguar qué tipo de producto preferirían para la formulación de un alimento funcional a base de cacao, siendo la tableta de chocolate el producto mayoritariamente seleccionado (Figura 59).



**Figura 59.** Selección del formato más adecuado para formular un alimento funcional a base de cacao a partir de los resultados de la investigación de marketing.

Los resultados de esta investigación nos darán pistas para poder formular nuevos productos innovadores en base a la opinión del consumidor y sus criterios de compra. De esta investigación se desprende la importancia de la alegación de salud que debe presentar un alimento funcional para garantizar la eficacia del mismo y poder, de este modo, convencer al consumidor de sus propiedades. En este sentido es estrictamente necesario educar al consumidor (Nielsen., 2015) e informar adecuadamente de las propiedades del alimento una vez se haya conseguido diseñar y formular un nuevo producto de calidad a base de ingredientes funcionales que demuestren su eficacia.



## Segunda parte:

Búsqueda de nuevos péptidos bioactivos del cacao para el diseño de nuevos alimentos funcionales en obesidad



# Materiales y Métodos

## (Segunda parte)



## 1. Muestra procedente del cacao seleccionada para la obtención de péptidos funcionales

El Barquillo es el nombre asignado al polvo de cacao proveniente tras el desgrasado y prensado de granos con cascarilla (Figura 60). Se obtiene a partir de semillas frescas de cacao y constituye un subproducto de la industria del cacao y nuestra muestra de estudio.

Este producto fue suministrados por Natraceutical S.A y, dado su contenido proteico, se utilizó para cuantificar la inhibición de la LP *in vitro* y obtener, tras un proceso de hidrólisis y purificación, posibles péptidos funcionales.

Para la evaluación de la actividad funcional de este subproducto, se trabajó con el sobrenadante obtenido tras disolver el Barquillo en agua destilada en una proporción 1:10 (p/v) y mantenerlo en agitación durante 1 hora a una temperatura de 50°C. Tras una centrifugación a 4.000 rpm durante 15min, se recuperó el sobrenadante que se utilizó como inhibidor en el ensayo de actividad de la LP.



Figura 60. Muestra de Barquillo obtenida de Natraceutical S.A.

## 2. Tratamiento de la muestra para la obtención de péptidos bioactivos

### 2.1. Preparación de la muestra e hidrólisis enzimática

Para abordar el proceso de hidrólisis se pesaron 10g de Barquillo y se disolvieron en 100mL de agua previamente atemperada a la temperatura óptima del preparado enzimático (50°C). Tras la adición de las enzimas (1µL/g) y su incubación, se detuvo la reacción calentando las muestras a 100°C durante 15min. Finalmente se llevó a cabo la centrifugación durante 15min a 4.000rpm para obtener el sobrenadante enriquecido en péptidos bioactivos para evaluar su actividad.

### 2.2. Selección de los preparados enzimáticos

Los preparados enzimáticos comerciales que se han utilizado en este trabajo son Alcalase® 2.4 L FG y Neutrase® seleccionadas como proteasas y la enzima Termamyl®

120L como  $\alpha$ -amilasa. Estos tres productos fueron suministrados por Novozymes (Bagsværd, Denmark) y se mantuvieron a 4°C.

### 2.3. Optimización del preparado enzimático

La optimización del proceso de hidrólisis se llevó a cabo en dos etapas en las que se combinó un preparado enzimático proteolítico, para la obtención de péptidos bioactivos, y una  $\alpha$ -amilasa para hidrolizar las proteínas glicosiladas. En primer lugar se seleccionó el preparado enzimático proteolítico Alcalase® 2.4 L FG y la enzima  $\alpha$ -amilasa Termamyl® 120L las cuales fueron incubadas a la temperatura óptima de la Alcalase® 2.4 L FG (50°C) junto con CaCl<sub>2</sub> (0.5g/g Barquillo) a distintos tiempos para optimizar el tiempo de hidrólisis. Las mejores condiciones de hidrólisis se fijaron en función de la capacidad inhibitoria de los péptidos resultantes para inhibir la lipasa pancreática (LP). En segundo lugar, una vez seleccionado el tiempo necesario para liberar péptidos con mayor actividad funcional, se testó la enzima Neutrase® en combinación con la  $\alpha$ -amilasa Termamyl® 120L y CaCl<sub>2</sub> (0.5g/g) para comparar su actividad respecto a la observada con la enzima Alcalase® 2.4 L FG manteniendo fijo el tiempo de hidrólisis, la temperatura de incubación y la dosis de enzima.

### 2.4. Determinación de los parámetros de calidad

#### *2.4.1. Análisis del contenido en proteínas y péptidos*

Para la determinación del contenido total de proteínas se utilizó el método de Bradford mientras que para la determinación del contenido en péptidos se empleó el método del ácido bicinconínico (BCA).

En primer lugar, el método de determinación del contenido de proteínas totales se basa en la propiedad del colorante Coomassie® azul brillante G-250 de unirse a proteínas, desplazándose su máximo de absorción de 465nm a 595nm. Este reactivo (BIOQUANT® 1.10306-Merck) se almacena en refrigeración y en función de la cantidad de proteína presente en la muestra, se lleva a cabo una dilución para encontrarse en uno de los intervalos de medida. El umbral de sensibilidad es de 1-15µg, e interfiere con contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. La medida de proteína de las muestras se llevó a cabo en un volumen final de 1mL utilizando 200µL de la muestra, preparada a diferentes diluciones y 800µL del reactivo de Bradford. Tras mezclar bien y mantener 15min a temperatura ambiente, se midieron las absorbancias a 595nm en cubeta de vidrio. A partir de las curvas de calibrado y el factor de dilución realizado, se determinó el contenido proteico de cada muestra.

En segundo lugar, el ácido bicinconínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu<sup>1+</sup> en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ion cuproso producido en una reacción entre

las proteínas con  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo nos permitieron seleccionarlo como el método más apropiado, dada su sensibilidad (0,5-10  $\mu\text{g}$ ) y su baja capacidad de interferir con otros compuestos. Para la cuantificación de los péptidos presentes en las muestras, se utilizaron 50 $\mu\text{L}$  de muestra junto con 1mL del reactivo de trabajo, obtenido tras mezclar 50mL del reactivo A y 1mL del reactivo B siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit-Thermo Scientific) y la mezcla resultante se incubó a 37°C durante 30min. Finalmente se midió la absorbancia a 562nm y se cuantificó el contenido peptídico.

#### 2.4.2. Análisis del contenido en polifenoles

Los fenoles totales se determinaron mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu usando ácido gálico como material de referencia. Para el análisis de las muestras, se añadió a 10 $\mu\text{L}$  de muestra 720 $\mu\text{L}$  de agua y 50 $\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se agitó e incubó durante 5min a temperatura ambiente y posteriormente se añadieron 150 $\mu\text{L}$  de una solución 1,88mM de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Tras 2h de incubación a temperatura ambiente se determinó la absorbancia a 765nm. El contenido de fenoles de cada fracción fue expresado en mg/L basándonos en la curva de calibración del ácido gálico (Yeddes, NN et al., 2014).

### 3. Compuestos antiobesidad

#### 3.1. Hidrolizado proteico

El hidrolizado proteico obtenido tras la hidrólisis del Barquillo con Termamyl<sup>®</sup> 120L y Alcalase<sup>®</sup> 2.4 L FG durante 1h a 50°C se sometió a una centrifugación durante 15min a 4.000rpm y se trabajó con el sobrenadante resultante. Este fue empleado para medir la inhibición *in vitro* de la actividad enzimática de la LP y la reducción de la acumulación de grasa *in vivo* con el modelo *C.elegans*.

#### 3.2. Fracciones cromatográficas de purificación

Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación del Barquillo hidrolizado se disolvieron en un volumen de agua y se filtraron a través de una membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ , quedando así preparados para iniciar el proceso de purificación llevado a cabo mediante varias etapas cromatográficas. Para la purificación de los péptidos, los sobrenadantes fueron sometidos a una primera cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC), un proceso de ultrafiltración y una posterior cromatografía de Fase Inversa (RPC) tal y como se describe a continuación:

##### 3.2.1. Purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC)

Previa a la purificación, a un volumen total de 900mL de sobrenadante se añadió  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,5M y se utilizó como tampón de equilibrado fosfato sódico 100mM, 1,5M

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7. Las fracciones se fueron eluyendo con tampón fosfato sódico 100mM en volúmenes de 10mL empleando un gradiente de 1,5 a 0M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En esta primera etapa cromatográfica, se utilizó la columna Hi-Prep 16/10 Phenyl FF column (GE Healthcare, Amersham Biosciences AB) acoplada en un sistema cromatográfico ÄKTA Explorer (Amersham Biosciences). La elución se monitorizó a 214nm y 280nm y se evaluaron cada una de las fracciones obtenidas frente a la LP.

### *3.2.2. Ultrafiltración por membranas de 10.000Da*

Las fracciones seleccionadas de la cromatografía HIC fueron sometidas a una ultrafiltración como paso previo a la cromatografía RPC. Para abordar el proceso de ultrafiltración, se utilizó una membrana de tamaño de corte 10.000Da (Amicon Ultra, Millipore) con el fin de separar físicamente los diferentes compuestos presentes en la muestra. El volumen resultante de la fracción inferior a 10.000Da conteniendo los péptidos bioactivos fue mantenido en refrigeración hasta abordar la siguiente etapa de purificación.

### *3.2.3. Purificación por cromatografía de fase inversa (RPC)*

La purificación por RPC, con la fracción inferior a 10.000Da, se llevó a cabo mediante el uso de una columna Resource 3mL (Amersham Biosciences) acoplada en el sistema cromatográfico ÄKTA Explorer (Amersham Biosciences) donde los péptidos se separaron utilizando los eluyentes 0,1% Ácido Trifluoroacético (TFA) en agua miliQ (A) y 0,1% TFA en acetonitrilo (B). La muestra se monitorizó a 214nm y 280nm y se recogieron fracciones de 2mL de las que se evaluó su actividad inhibidora de la LP.

## 3.3. Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos utilizados en este estudio se obtuvieron de una compañía externa (GenScript Corporation Piscataway, EEUU <http://www.genscript.com/>). Todos ellos se solicitaron a una pureza superior al 90%. Los péptidos se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa y su identidad se confirmó por espectrometría de masas MALDI-TOF. Los Anexos 2 y 3 contienen los certificados de análisis de los péptidos puros sintetizados DNYDNSAGKWWVT y NYDNSAGKW respectivamente. Todos los péptidos se sintetizaron sin modificación en sus extremos amino y C- terminal y tenían una carga neta positiva. En función de la naturaleza de los péptidos, se llevó a cabo su disolución en agua o con un porcentaje de diferentes disolventes. En nuestro caso, se añadió DMSO para lograr la disolución total de cada uno de los péptidos de estudio.



#### 4. Identificación de los péptidos funcionales

La identificación de los péptidos presentes en las fracciones provenientes de las muestras hidrolizadas con proteasas comerciales se llevó a cabo en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) Carlos III mediante MALDI-TOF. La ionización MALDI se basa en el empleo de una sustancia matriz capaz de absorber radiación ultravioleta (UV). La matriz y la muestra se mezclan y se depositan sobre un portamuestras donde, una vez evaporado el disolvente, las moléculas de analito cocrystalizan embebidas en los cristales de la matriz. De esta manera, cuando estos cristales son irradiados con un láser UV, la matriz absorbe energía del haz y sublima parcialmente, arrastrando a los analitos intactos hacia la fase gaseosa. El intercambio de protones entre las moléculas de analito y las de la matriz genera moléculas de analito cargadas (iones) que son aceleradas por un campo eléctrico y generalmente pasan a recorrer la región de deriva de un analizador de tiempo de vuelo (*time of flight*, TOF), en la que los iones son separados en función de su masa. Tras la región de deriva, un reflector permite compensar las pequeñas dispersiones de energía cinética asociadas a una determinada población de iones. Para la identificación de una secuencia peptídica, se utilizaron los instrumentos TOF/TOF que posibilitan la rápida obtención de los espectros de fragmentación generados por descomposición inducida por láser de iones moleculares metaestables.


Para el análisis de masas mediante MALDI, la mezcla se depositó en un portamuestras MALDI pretratado AnchorChip de 600 $\mu$ m (Bruker Daltonik) y se dejó secar a temperatura ambiente. El análisis de masas de las muestras se realizó de forma automática en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonik) empleando calibración interna bajo el control del programa FlexControl. En una primera etapa se dividieron los espectros de masas MALDI-TOF/TOF en el intervalo 800-4.000Da a una frecuencia de láser de 50Hz. Los espectros MALDI-MS fueron calibrados internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina con  $m/z=842,510$  y  $m/z=2211,105$ . En una segunda etapa, se llevó a cabo el análisis de los iones fragmento en modo tándem (MS/MS) de aquellos iones precursores cuya relación señal-ruido en el espectro MALDI-MS superaba un valor umbral. Los precursores fueron acelerados a 8kV y los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser fueron de nuevo acelerados a 19kV y analizados en el reflector de iones. La calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo  $m/z=800-3.200$ . El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el software flexAnalysis (Bruker Daltonik). Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa BioTools (Bruker Daltonik) para buscar en una base de datos no redundante (NCBIInr; 6.5x10<sup>6</sup> entradas;

National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EEUU) empleando el software Mascot.

## **5. Estudio de las interferencias entre compuestos para el diseño de un posible alimento funcional**

Para realizar este estudio, se seleccionó como matriz alimentaria un producto de cacao con alto contenido en polifenoles y se evaluó la posible interferencia de estos compuestos con los péptidos bioactivos de la fracción inferior a 3.000Da del hidrolizado proteico del Barquillo en relación con la actividad de la LP.

Para ello se partió de dos productos de cacao con alto contenido en polifenoles: CcoanOX 45% (CCX 45%) suministrado por Natraceutical S.A. y CcoanOX 45% soluble en agua (ws) (CCX 45%ws) (Producto comercializado por Nutrafur S.A. como Cocoa Extract Water Soluble) (Figura 61). CcoanOX (CCX) es un polvo de cacao obtenido mediante un procedimiento industrial que preserva los compuestos fenólicos contenidos naturalmente en los granos de cacao. La empresa Natraceutical S.A. patentó este procedimiento en España con número P200600462 y fecha de solicitud 27/02/06 (Cienfuegos-Jovellanos E et al., 2006). Dicha empresa con posterioridad solicitó este registro como Patente Europea con número EP2036601 y con fecha 27/02/07 y extendió la solicitud como una Patente Internacional vía PCT con número WO2007/096449. La obtención de este polvo de cacao es posible gracias a un procedimiento industrial muy similar al convencional, pero en el cual se incluyen algunas modificaciones. Los cambios más destacados en el proceso de elaboración de CCX, respecto al proceso convencional incluyen la selección de un grano de cacao concreto, la eliminación del proceso de fermentación y la adición de una etapa de escalado, basada en la inactivación de la enzima polifenol oxidasa. Con ello se evita la oxidación de los distintos polifenoles contenidos en CCX y permite preservar la mayor parte de los polifenoles inicialmente presentes en el grano de cacao.







Certificado de análisis nº Certificate of analysis nº		Science Extracts of Nature Date: 7/06/12
Producto: COCOA EXTRACT WATER SOLUBLE		
Product:		
Código/Lote: Code/Batch: 4006608F001	Fecha fabricación: Manuf. date: JUNE/08	Cantidad: Quantity: 25g
Nombre botánico: Botanical name: <i>Theobroma cacao</i>	Parte de la planta: Part of plant used: Nib	
Aspecto: Appearance: Hygroscopic red-violet powder		
Solubilidad: Solubility: Soluble in water at room temperature at 10 g/l		
<b>Especificaciones Analíticas</b> Analytical specifications	<b>Resultados</b> Results	<b>Valor requerido</b> Standard Values
LOSS ON DRYING	5,44%	Less than 6%
HEAVY METALS	conforms	Less than 20 ppm
<b>SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY</b> Total polyphenols as catechin	46,09%	More than 45%
<b>HPLC ASSAY</b> Theobromine (vs standard, db)	10,03%	More than 5%
Total flavanols (as catechin)	29,59%	More than 25%
Flavan-3-ols: (vs corresponding standard)		
Epicatechin	10,96%	
Catechin	1,04%	
Dimer B2	7,10%	
Dimer B1	0,96%	
TOTAL	20,06%	More than 15%
<b>ETHANOL</b>	conforms	Less than 5000 ppm
pH (1%)	3,15	2-5
<b>ENSAYO MICROBIOLÓGICO</b> MICROBIOLOGICAL ASSAY		
Total Plate count	conforms	Less than 10.000/g
Yeast and Mould	conforms	Less than 100/g
Enterobacteriaceae	conforms	Less than 100/g
E. Coli	conforms	Negative/g
Salmonella spp	conforms	Negative/25g
<b>Carrier</b>	Maltodextrins non GMO NON GMO PRODUCT NOT IRRADIATED PRODUCT	
Fecha de caducidad: Shelf life: 12 months unopened stored in a cool and dry location.		
		Director de Laboratorio Control de Calidad
 NUTRAFUR S.A. Cno. Viejo de Pilego, Km. 2 - Apartado 192 - 30820 Alcantarilla (Murcia) Spain Tel. 34 968 892855 - Fax 34 968 806512 www.nutrafur.com nutrafur@nutrafur.com Registro Mercantil de Murcia, Sec. 9ª / Hoja MU-2190. C.I.F. Nº A 3009096 - R.D.S.A. Nº 31 - 01892/MU		
		

Figura 61. Certificado de análisis del producto comercial Cocoa Extract Water Soluble (CocoanOX 45%ws).

El estudio de las interferencias entre compuestos se llevó a cabo adicionando a 1µg/mL de CCX 45%ws, diferentes concentraciones de la fracción inferior a 3.000Da del hidrolizado proteico obtenido tras la hidrólisis del Barquillo con Termamyl® 120L y Alcalase® 2.4 L FG. Concretamente se adicionaron las siguientes concentraciones: 0,01mg/mL; 0,06mg/mL; 0,13mg/mL; 0,25mg/mL; 0,50mg/mL; 1mg/mL y 2mg/mL. La muestra resultante se sometió a agitación a temperatura ambiente durante 5min y se evaluó *in vitro* frente a la LP llevando por separado los controles del CCX 45%ws y de las diferentes concentraciones de la fracción inferior a 3.000Da del hidrolizado.

## 6. Método *in vitro* de inhibición de la actividad enzimática de la lipasa pancreática (LP)

La inhibición de LP se determinó empleando 4-methylumbelliferyl oleate (4MUO) como sustrato siguiendo lo descrito por Sugiyama H et al., 2007. 25µL de cada inhibidor

(hidrolizado, una fracción de purificación o un péptido sintético) se mezclaron con 25 $\mu$ L de LP en solución (1mg/mL Sigma Aldrich) y se preincubaron durante 10min a 26°C con una agitación de 500rpm. Se inició la reacción adicionando 50 $\mu$ L de 4MUO (0,1mM) disuelto en tampón Dulbecco's phosphate. Tras la incubación a 26°C durante 20min en agitación constante (500rpm) se detuvo la reacción mediante la adición de 100 $\mu$ L de tampón Citrato sódico 0,1M (pH 4,2). La cantidad de 4-methylumbelliferone liberado se determinó utilizando un espectrofluorímetro (FP-6200 Jasco) a una longitud de onda de excitación de 320nm y una longitud de onda de emisión de 450nm. La actividad inhibitoria se expresó como porcentaje con respecto al control sin inhibidor. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado.

El análisis de los resultados obtenidos con los distintos productos se realizó mediante el análisis de la inhibición producida por distintas concentraciones de cada producto, lo que dio lugar a curvas concentración-efecto ajustadas por regresión no-lineal mediante el programa Graph Pad Prism (versión 4.0, San Diego, California). Se define el  $E_{max}$  como el porcentaje de inhibición de la LP obtenido con la concentración más elevada de cada compuesto. Se define la concentración inhibitoria 50% ( $IC_{50}$ ) como la concentración de producto capaz de producir el 50% de inhibición de la actividad de la enzima, y se calcula matemáticamente a partir de las curvas ajustadas mediante el programa Graph Pad Prism.

Los valores se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el test de la t de Student, cuando se comparan dos muestras independientes, o por medio del ANOVA seguido del test de Dunnett, utilizando el programa Graph Pad Prism. Las diferencias se consideran significativas para una  $p < 0,05$ .

## 7. Modelo simulado de digestión gastrointestinal

El modelo simulado de digestión *in vitro* consistió en someter los péptidos sintéticos a las tres fases de las que consta el tracto gastrointestinal, siguiendo las pautas descritas en la bibliografía (Granado-Lorencio et al., 2007). En primer lugar se simuló la etapa oral adicionando a cada uno de los péptidos analizados de manera independiente una solución simulada de saliva (pH 6,5) y se incubó la mezcla a 37°C con agitación leve, imitando la masticación. Transcurridos 5min se adicionó una solución simulada de jugo gástrico (pH 1,5) y se incubó durante 2h a 37°C con una leve agitación, simulando lo que ocurre con el bolo alimenticio a nivel del estómago. Finalmente se adicionó una solución simulada intestinal (pH = 8) y el conjunto se incubó 2h a 37°C con leve agitación, para simular el avance del bolo alimenticio a nivel intestinal.

La fase oral estaba formada por una solución preparada a pH 6,5 que contenía las enzimas lisozima (0,01%) y  $\alpha$ -amilasa (0,145g/L). La fase gástrica la compuso una

solución a pH 1.5 que contenía BSA (1g/L), pepsina (1g/L) y mucina (1g/L). Finalmente, la fase intestinal, se formó con una solución a pH 8 que contenía pancreatina porcina (3g/L), bilis bovina (80 g/L), lipasa pancreática (9g/L), colesterol esterasa (2,74m/L), fosfolipasa A2 (0,15mL/L) y taurocolato sódico (0,6g/L).

**FASE ORAL:** Se tomaron 1,5mg de los productos por separado y se añadieron 25 $\mu$ L de DMSO para resuspenderlos. Posteriormente se inició la reacción adicionando 318,5 $\mu$ L de la solución de saliva (0,896g KCl; 0,2g KSCN; 1,02g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O; 0,57g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,298g NaCl; 1,8mL NaOH 1M; 0,2g Urea en 1L de agua MilliQ) a pH 6,5 previamente atemperada hasta obtener un volumen final de 343,5  $\mu$ L con una concentración del producto de 4,3 mg/mL. Se incubó la muestra a 37°C durante 5min en agitación a 500rpm. Transcurrido ese tiempo, se tomaron 30 $\mu$ L y se mezcló con 270 $\mu$ L de solución de saliva sin enzimas llegando a un volumen final de 300 $\mu$ L (0,43 mg/mL de producto). Se cogieron 32 $\mu$ L de esta muestra y se analizaron por HPLC (13 $\mu$ g de producto).

**FASE GÁSTRICA:** A los 313,5 $\mu$ L de muestra restantes de la fase oral, se añadieron 470 $\mu$ L de jugo gástrico (2,75g NaCl; 0,304g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O; 0,824g KCl; 0,4g CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O; 0,306g NH<sub>4</sub>Cl; 0,65g glucosa; 0,02g ácido glucurónico; 0,085g urea; 0,33g hidrocloreuro de glucosamina en 1L de agua MilliQ) a pH1,5 hasta un volumen final de 783,5 $\mu$ L quedando el producto a una concentración de 1,721mg/mL. Se incubó la muestra durante 2h a 37°C en agitación a 500rpm. Transcurridos los primeros 30min de incubación en la fase gástrica, se tomó una alícuota (50 $\mu$ L) y se mezcló con 100 $\mu$ L de solución de saliva sin enzimas y 150 $\mu$ L de solución gástrica sin enzimas, llegando a un volumen final de 300 $\mu$ L y una concentración de producto de 0,28mg/mL. Se cogieron 48  $\mu$ L de esta muestra y se analizaron por HPLC (13 $\mu$ g de producto). Se mantuvo 90min más la incubación de la fase gástrica, se tomó una alícuota de 50 $\mu$ L y se mezcló con 100 $\mu$ L de solución de saliva y 150 $\mu$ L de solución gástrica, ambas sin enzimas, llegando a un volumen final de 300 $\mu$ L.

**FASE INTESTINAL:** Finalmente se adicionó a la muestra restante (683,5 $\mu$ L), un volumen de 1022,4 $\mu$ L de solución intestinal y se incubó durante 2h a 37°C en agitación a 500rpm. En este instante la concentración de producto era 0,689mg/mL. Transcurridos 15min, 30min, 60min y 120min, se tomaron diferentes alícuotas de 300 $\mu$ L y 20 $\mu$ L de estas muestras y se analizaron por HPLC, representando una cantidad de producto de 13 $\mu$ g como en los casos anteriores. El blanco de la solución intestinal sin enzimas provenía de mezclar 25mL de jugo duodenal (7,012g NaCl; 3,388g NaHCO<sub>3</sub>; 0,08g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,564g KCl; 0,106g MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O; 180 $\mu$ L HCl al 37% y 0,1g Urea en 1L de agua MilliQ) y 7,5mL de solución biliar (5,26g NaCl; 5,78g NaHCO<sub>3</sub>; 0,376g KCl; 200mL HCl al 37% y 0,25g Urea en 1L de agua MilliQ).

Las alícuotas que se obtuvieron en cada una de las tres fases se llevaron a ebullición durante 10min para detener la reacción. El control del proceso se realizó incluyendo blancos de enzima y blancos de sustrato en cada una de las fases.

El análisis de las muestras se llevó a cabo por una Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) (Waters 1525) acoplado a un detector de fotodiodos (Waters, PDA 2998) con una columna Ultrabase C18 (5 $\mu$ m, 4,6\*250mm, Análisis Vínicos LO254). Los eluyentes empleados fueron Agua MilliQ+0,1% TFA (A) y Acetonitrilo+0,1% TFA (B). La longitud de onda seleccionada para la detección de péptidos fue de 214nm.

## **8. Estudio *in vivo* de reducción de grasa en el modelo sencillo *Caenorhabditis elegans***

La evaluación *in vivo* de la reducción en la acumulación de grasa se llevó a cabo en el laboratorio de evaluación del Departamento de Biotecnología Agroalimentaria de Biópolis. Para ello, se trabajó con la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* obtenida de *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC) de la University of Minnesota (USA) que se mantuvo a 20°C en el medio de cultivo NG (3g NaCl; 17g agar; 2,5g peptona en 95mL de agua y autoclavar. A continuación se añadió 1mL CaCl<sub>2</sub> (1M); 1mL de una solución de 5mg/mL de colesterol en etanol; 1mL MgSO<sub>4</sub> y 25mL 1M KPO<sub>4</sub>). La cepa *Escherichia coli* OP50 se utilizó como dieta habitual del nematodo y también se obtuvo del CGC. Los nematodos fueron sincronizados mediante el aislamiento de los huevos en las placas con NG o con NG enriquecidas con diferentes concentraciones del hidrolizado proteico o del compuesto puro a analizar y crecieron a 20°C durante 4 días hasta alcanzar el estado adulto, momento en el cual se introdujeron los nematodos en tampón M9 (3g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5g NaCl, 1mL 1M MgSO<sub>4</sub>, y enrasar hasta 1L con agua y autoclavar) y se analizó el contenido lipídico mediante tinción con Rojo de Nilo (9-diethylamino-5H-benzo\* $\alpha$ +phenoxazin-5-one, Sigma, St. Louis, MO, USA) preparado a una concentración final de 0,05 $\mu$ g/mL. La cuantificación de la fluorescencia emitida por el nematodo se llevó a cabo mediante el uso de un fluorímetro FP-6200 system (JASCO Analytical Instruments, Easton, MD, USA) a una longitud de onda de excitación de 480nm and 571nm de emisión. Un total de 100 nematodos fueron analizados por cada condición y los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Orlistat fue utilizado como control positivo a 6 $\mu$ g/mL.

## **9. Análisis transcriptómico en *Caenorhabditis elegans***

El estudio transcriptómico se llevó a cabo en el laboratorio de evaluación del Departamento de Biotecnología Agroalimentaria de Biópolis, utilizando la cepa N2 cultivada en el medio de cultivo NG, suplementado con el producto a estudiar. Se trabajó con una población de nematodos sincronizados, mediante el aislamiento de los huevos de los adultos, hasta alcanzar la misma edad (jóvenes adultos). Los nematodos se mantuvieron a 20°C hasta el final del experimento y al alcanzar el tercer día de edad, se recogieron las muestras en tubos eppendorf y se suspendieron en tampón de lisis (M9). Las muestras obtenidas se utilizaron para la extracción de Ácido Ribonucleico (ARN) usando el kit de RNAasy (Qiagen) y se llevó a cabo una sonicación (3 pulsos a 10

W, 20 s/pulso) El ARN se cuantificó midiendo la absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro y la relación de 260/280 se determinó también para analizar la pureza de la muestra. Posteriormente, la integridad de las muestras de RNA se estudió mediante un Bio-analizador (Agilent). El análisis del genoma completo de *C. elegans* se realizó utilizando GeneChip® *C. elegans* genoma matriz de Affymetrix y la información fue corregida utilizando la metodología del Robust Multi-array Average (RMA) (Irizarri RA et al., 2003). Este trabajo se externalizó al Servei d'Investigació de la Universitat de València.

Por último, el análisis bioinformático, realizado en la empresa Genometra, se utilizó para definir el/los gen/es, las vías metabólicas y procesos biológicos inducidos selectivamente y / o reprimidos por el péptido. En cada una de las comparaciones realizadas entre muestra y control, se llevó a cabo un análisis estadístico (Smyth GK, 2004) y se utilizaron modelos de regresión logística (Sartor MA et al., 2009; Montaner D et al., 2010). Los experimentos se realizaron por triplicado.





# Resultados y Discusión

## (Segunda parte)



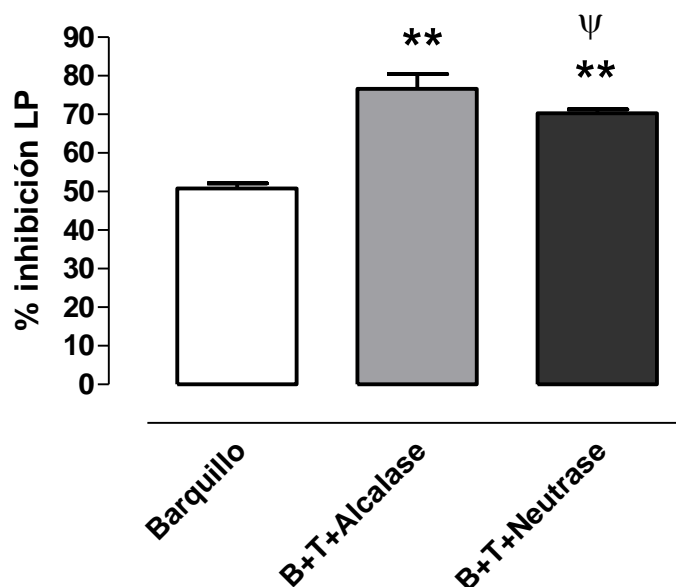
## 1. Caracterización del Barquillo y obtención de los compuestos antiobesidad

### 1.1. Estudio de la actividad inhibitoria de la lipasa pancreática por el Barquillo

Se evaluó el efecto inhibitorio de la LP por el subproducto del cacao, Barquillo. Se llevaron a cabo tres estudios independientes por triplicado y se cuantificó, mediante ensayos en placas multipocillo, su capacidad inhibitoria. Se utilizó como inhibidor el sobrenadante obtenido al disolver en agua el Barquillo al 10% (p/v) y centrifugar durante 15min a 4.000 rpm, obteniéndose un valor de inhibición de  $50,8 \pm 1,3\%$ . Posteriormente se analizó, siguiendo la metodología descrita en los apartados 2.4.1 y 2.4.2, el contenido en proteínas, por Bradford, y en polifenoles, por Folin Ciocalteu, del Barquillo siendo 11,05% y 1,36% respectivamente.

### 1.2. Hidrólisis enzimática para la obtención de péptidos bioactivos

Tras el proceso de hidrólisis, en el que se incubó el Barquillo con las enzimas Termamyl® 120L y Alcalase® 2.4 L FG o con las enzimas Termamyl® 120L y Neutrase®, se inactivaron las enzimas, y los sobrenadantes recogidos tras centrifugación (15min a 4.000rpm) se evaluaron frente a la LP (Figura 62).



**Figura 62.** Resultados de inhibición de LP por los sobrenadantes obtenidos en las diferentes condiciones de hidrólisis (\*\*  $P < 0,01$  vs Barquillo,  $\Psi$   $P < 0,05$  vs Barquillo + Termamyl® 120L + Alcalase®).

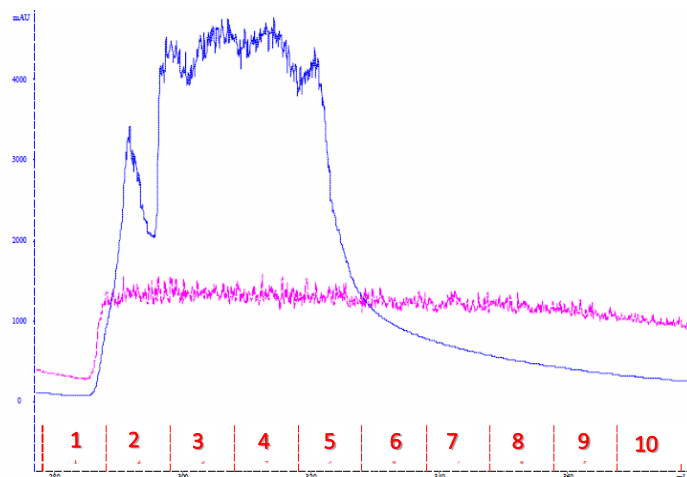
Los resultados mostraron que el tratamiento del Barquillo, tanto con Alcalase® 2.4 L FG como con Neutrase®, ambos en combinación con la Termamyl® 120L, generó péptidos bioactivos con mayor capacidad inhibitoria de la LP respecto al Barquillo sin hidrolizar. Debido al menor coste de la Alcalase® 2.4 L FG (220€/250mL) respecto a la Neutrase®

(247€/250mL) y al mayor porcentaje de inhibición observado, se seleccionó el hidrolizado proteico generado por la hidrólisis con Termamyl® 120L y Alcalase® 2.4 L FG para abordar el proceso de purificación, con el fin de identificar los péptidos responsables de la inhibición.

### 1.3. Purificación e identificación de los péptidos responsables de la inhibición

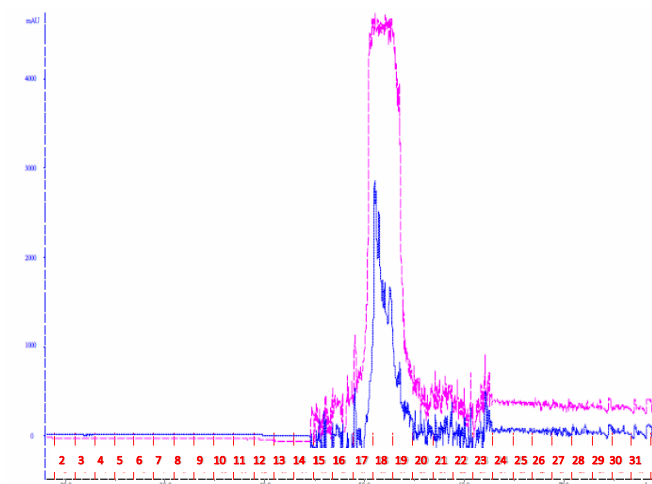
Con el fin de aislar e identificar los péptidos derivados del Barquillo hidrolizado, se llevaron a cabo sucesivas etapas de cromatografía, siguiendo los métodos descritos en los apartados 3.2.1. y 3.2.3.

En primer lugar, se prepararon 900mL de Barquillo hidrolizado conteniendo 1,5M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y se recogieron todas las fracciones eluidas tras su paso por la columna HiPrep 16/10 llevando a cabo una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) (Figura 63). Cada una de ellas se evaluó frente a la actividad de la LP y se seleccionaron, únicamente, aquellas capaces de producir una inhibición en la enzima.



**Figura 63.** Cromatograma de interacción hidrofóbica del Barquillo hidrolizado (Rosa: OD 214nm; Azul: OD 280nm).

Las fracciones con mayor actividad inhibitoria de la LP fueron la 3, 4 y 5 cuyos porcentajes de inhibición fueron  $12,3 \pm 1,6\%$ ;  $42,6 \pm 4,9\%$  y  $19,3 \pm 4,1\%$  respectivamente, no detectándose actividad en el resto de fracciones. Tras estos resultados, en segundo lugar, se seleccionaron la fracción 4 (F4) y la fracción 5 (F5) para abordar las siguientes etapas de purificación. Por un lado, los 10mL recogidos de la F4 se ultrafiltraron por 10.000Da y se sometieron a una cromatografía de fase inversa (RPC), donde los péptidos fueron eluidos, tal y como se muestra en la Figura 64.



**Figura 64.** Cromatograma de fase inversa de la fracción 4 proveniente de la cromatografía de interacción hidrofóbica del Barquillo hidrolizado (Rosa: OD 214nm; Azul: OD 280nm).

De esta purificación se recogieron las fracciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23 y se evaluó la actividad funcional de los péptidos presentes en las mismas frente a la LP. La Tabla 38 recoge los porcentajes de inhibición de la LP observados para cada una de ellas, no detectándose actividad en las fracciones 16, 21, 22 y 23.

**Tabla 38.** Actividad inhibidora de la lipasa pancreática por las fracciones obtenidas de la cromatografía de fase inversa provenientes de la fracción 4 de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Fracciones de purificación	% Inhibición LP
F17	18,8 ± 6,7
F18	61,7 ± 3,1
F19	14,7 ± 2,6
F20	11,2 ± 3,3

En base a los resultados, se seleccionó la fracción 18 para abordar la identificación de los péptidos presentes en la misma por MALDI-TOF siguiendo la metodología descrita en el apartado 8.

El análisis por MALDI-TOF de esta fracción reveló la presencia de un único péptido proveniente de la albúmina 21KDa (Inhibidor de la tripsina) formado por 13 aminoácidos. Este péptido, con secuencia de aminoácidos DNYDNSAGKWWVT presenta el espectro de fragmentación que se muestra en la Figura 65.

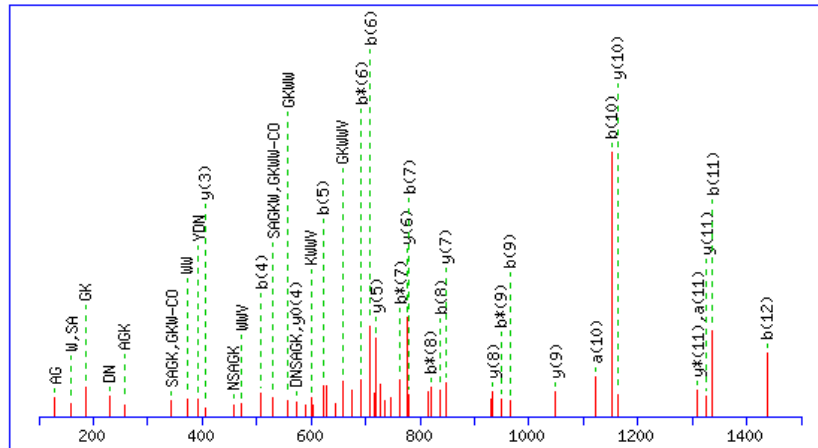
**Peptide View**

MS/MS Fragmentation of **DNYDNSAGKWWVT**  
 Found in **gi|19171719**, trypsin inhibitor [Theobroma cacao]

Match to Query 3: 1554.672724 from(1555.680000,1+)  
 Data file DATA.TXT

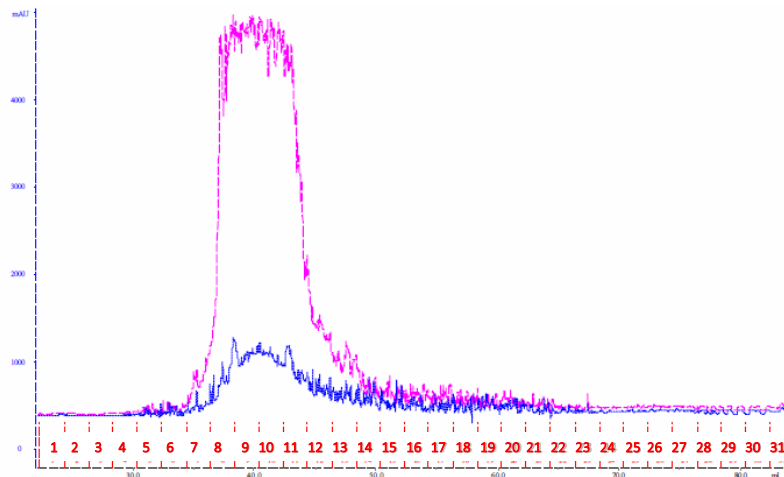
Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from  to  Da



**Figura 65.** Espectro de fragmentación del péptido funcional 13-mer (DNYDNSAGKWWVT) identificado.

Por otro lado, se purificó también por RPC la fracción 5 proveniente de la HIC del hidrolizado del Barquillo tras la ultrafiltración por 10KDa y se evaluó la inhibición de la LP por las fracciones F8, F9, F10, F11, F12 y F13 (Figura 66).



**Figura 66.** Cromatograma de fase inversa de la fracción 5 proveniente de la cromatografía de interacción hidrofóbica del Barquillo hidrolizado (Rosa OD: 280 nm; Azul OD: 214 nm).

La Tabla 39 recoge los porcentajes de inhibición de la LP observados para cada una de ellas, no detectándose actividad en las fracciones 8 y 13.

**Tabla 39.** Actividad inhibidora de la LP por las fracciones obtenidas de la cromatografía de fase inversa provenientes de la fracción 5 de la cromatografía de interacción hidrofóbica.

Fracciones de purificación	% Inhibición LP
F9	15,1 ± 0,9
F10	12,0 ± 4,1
F11	25,0 ± 3,9
F12	7,0 ± 3,4

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó la fracción 11 (F11) y se identificaron por MALDI-TOF los siguientes péptidos presentes en la misma: RRSDLNCTPVIF (13-mer bis); TSTVWRLDNYDNSA (14-mer); DNYDNSAGKWWVT (13-mer); DNYDNSAGKWWVTTD (15-mer) (Figura 67).

#### Results List

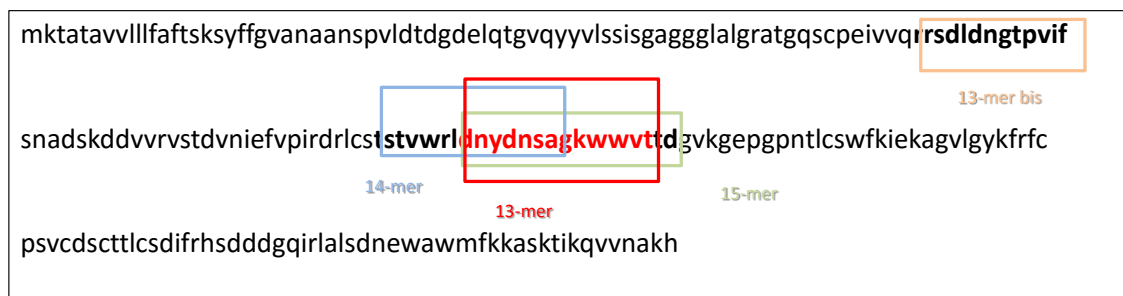
```

1. gi119171719 Mass: 16572 Score: 121 Expect: 4.7e-06 Queries matched: 4
   trypsin inhibitor [Theobroma cacao]
   Observed Mr(expt) Mr(calc) ppm Start End Miss Ions Peptide
   1489.7651 1488.7578 1488.7685 -7.17 46 - 58 0 --- Q.RRSDLNCTPVIF.S
   1555.6800 1554.6727 1554.6739 -0.77 95 - 107 0 113 L.DNYDNSAGKWWVT.T
   1641.7644 1640.7571 1640.7431 8.55 88 - 101 0 --- S.TSTVWRLDNYDNSA.G
   1771.7483 1770.7411 1770.7486 -4.22 95 - 109 0 --- L.DNYDNSAGKWWVTTD.G
   No match to: 1329.5452

```

**Figura 67.** Resultados de identificación por MALDI-TOF de los péptidos presentes en la fracción 11 proveniente de la cromatografía de fase inversa.

De los cuatro péptidos identificados en esta fracción se comprobó que tres de ellos provenían de la misma región de la albúmina (Figura 68).



**Figura 68.** Secuencia de la albúmina (inhibidor de la tripsina).

Se observó que el péptido 13-mer, identificado como péptido único en la F18 de RPC proveniente de la F4HIC, volvía a estar presente en la F11 proveniente de la F5HIC, por lo que podemos concluir que el péptido 13-mer tiene un efecto significativo en la actividad inhibitoria de la LP dado que es el único péptido identificado en las fracciones purificadas del Barquillo hidrolizado que presentan mayor actividad funcional.

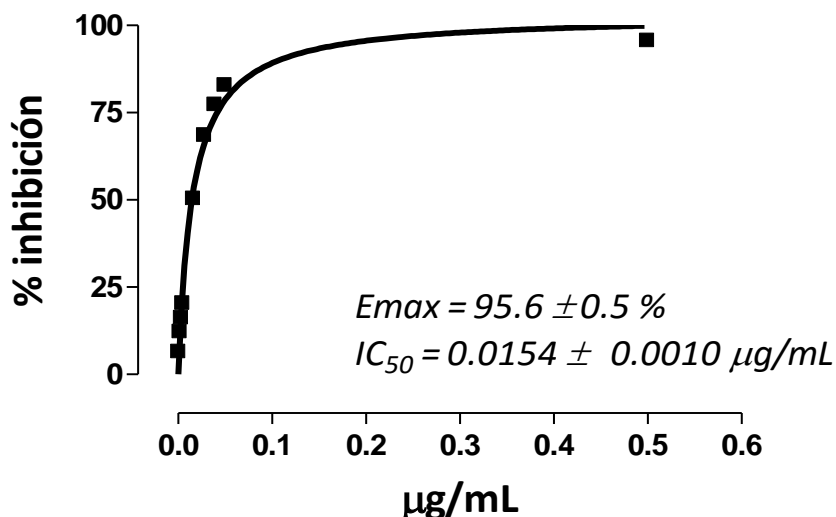
#### 1.4. Evaluación funcional *in vitro* de los compuestos antiobesidad

Se realizaron curvas concentración-respuesta para determinar la actividad funcional del Orlistat como control positivo y de las siguientes muestras provenientes del Barquillo:

- i) Hidrolizado proteico obtenido tras la incubación con Termamyl® 120L y Alcalase® 2.4 L FG.
- ii) Hidrolizado proteico ultrafiltrado siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.2.2. pero utilizando membranas de tamaño de corte de 3.000Da a fin de obtener únicamente una fracción enriquecida en péptidos funcionales.
- iii) Péptido 13-mer identificado en las fracciones de purificación con mayor actividad frente a la LP. Para disponer de cantidad suficiente del péptido 13-mer para realizar este ensayo, se llevó a cabo su síntesis química de acuerdo al método descrito en el apartado 3.3.

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

Se observó que el Orlistat, fármaco utilizado ampliamente en tratamientos para la obesidad y comercializado en farmacias bajo el nombre Xenical, produjo el 50% de inhibición de la LP a una concentración de 0,01545  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 69).

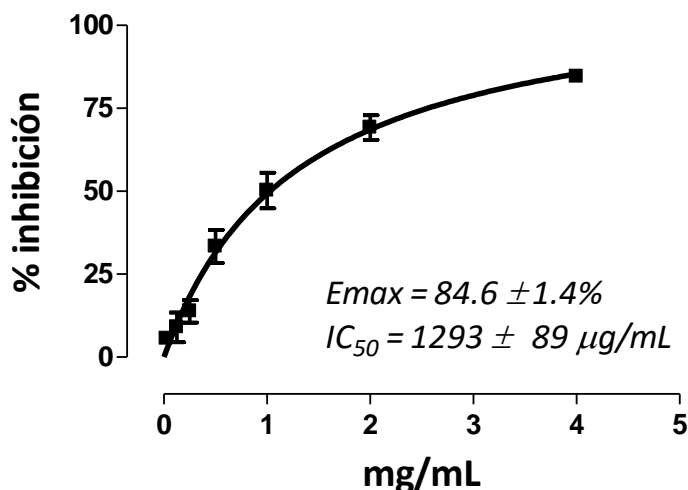


**Figura 69.** Efecto de distintas concentraciones de Orlistat sobre la actividad de la LP.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del % de inhibición respecto a la actividad LP de la muestra control ( $n=3$ );  $E_{\text{max}}$  = inhibición máxima obtenida con la concentración mayor;  $IC_{50}$  = concentración del producto que inhibe el 50% de la actividad enzimática.



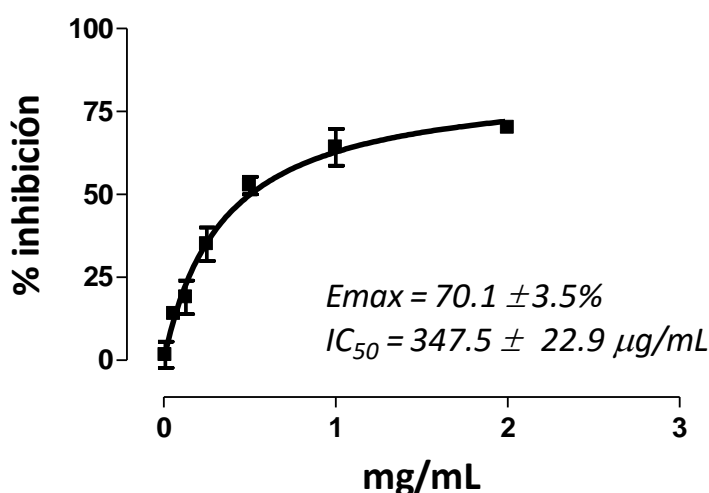
Respecto al hidrolizado, se llevó a cabo el mismo análisis de actividad, obteniéndose un valor  $IC_{50}$  de 1293  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 70).



**Figura 70.** Efecto de distintas concentraciones del hidrolizado proteico del Barquillo sobre la actividad de la LP.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del % de inhibición respecto a la actividad LP de la muestra control ( $n = 3$ );  $E_{max}$  = Inhibición máxima obtenida con la concentración mayor;  $IC_{50}$  = concentración del producto que inhibe el 50% de la actividad enzimática.

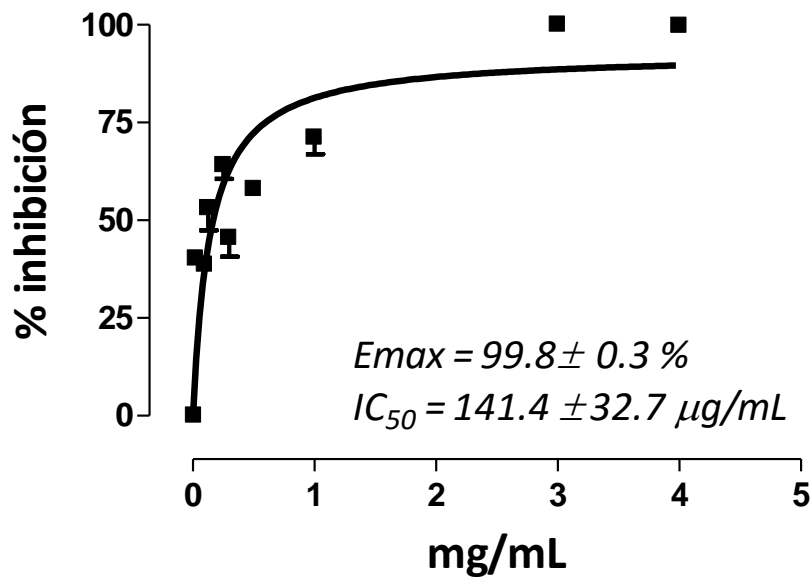
Del hidrolizado proteico del Barquillo, se realizó una ultrafiltración con membranas de 3.000Da y con la fracción inferior, se evaluó la actividad de la LP (Figura 71), observándose una mayor actividad respecto al hidrolizado proteico.



**Figura 71.** Efecto de distintas concentraciones de la fracción inferior a 3.000Da proveniente del hidrolizado proteico del Barquillo sobre la actividad de la LP.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del % de inhibición respecto a la actividad LP de la muestra control ( $n = 3$ );  $E_{max}$  = Inhibición máxima obtenida con la concentración mayor;  $IC_{50}$  = concentración del producto que inhibe el 50% de la actividad enzimática.

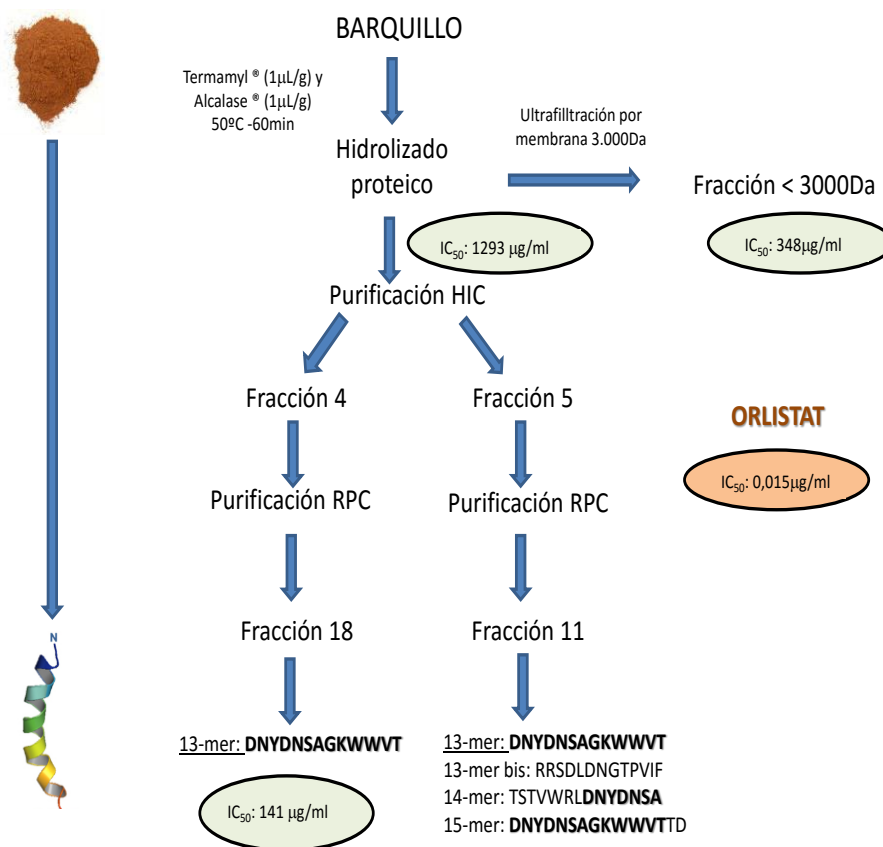
En relación con el péptido 13-mer, los resultados obtenidos *in vitro* y reflejados en la Figura 72 muestran el valor máximo de inhibición de la LP por este péptido puro y su  $IC_{50}$ . Este valor es inferior al obtenido con la fracción de péptidos inferior a 3.000Da y comparable a otros compuestos, descritos en la literatura y evaluados con la misma metodología, como la catequina o epicatequina cuyos valores de  $IC_{50}$  son superiores a 0,125mg/mL (Sugiyama H et al., 2007).



**Figura 72.** Efecto de distintas concentraciones del péptido 13-mer sobre la actividad de la LP.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del % de inhibición respecto a la actividad LP de la muestra control (n =3); Emax = Inhibición máxima obtenida con la concentración mayor;  $IC_{50}$  = concentración del producto que inhibe el 50% de la actividad enzimática.

El análisis de estos resultados nos acerca a la Figura 73 donde se ilustra el proceso de obtención del péptido 13-mer identificado en dos fracciones de purificación por fase inversa, procedentes de diferentes fracciones de la cromatografía HIC y de todas las fracciones evaluadas frente a la LP.



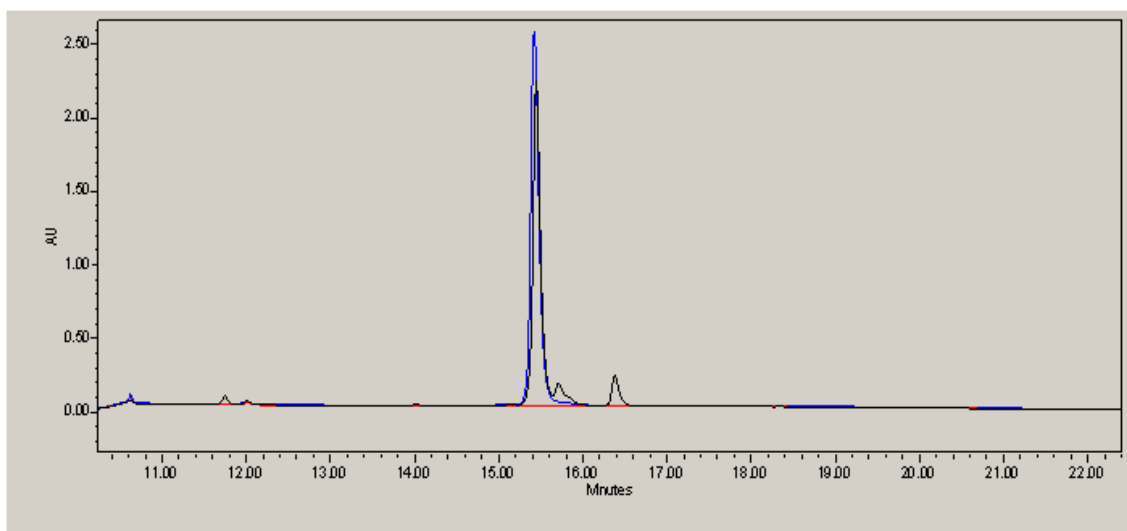
**Figura 73.** Esquema del procedimiento seguido para la obtención de los compuestos funcionales del Barquillo y concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) obtenida en los ensayos de inhibición de la actividad de la lipasa pancreática.

En base a estos resultados y considerando que los estudios *in vitro* deben completarse con estudios en modelos *in vivo*, se planteó, en primer lugar, analizar el comportamiento del péptido 13-mer a lo largo del tracto gastrointestinal humano siguiendo la metodología descrita en el apartado 7.

## 2. Estudio de la estabilidad de los compuestos funcionales tras su paso por un sistema simulado de digestión gastrointestinal

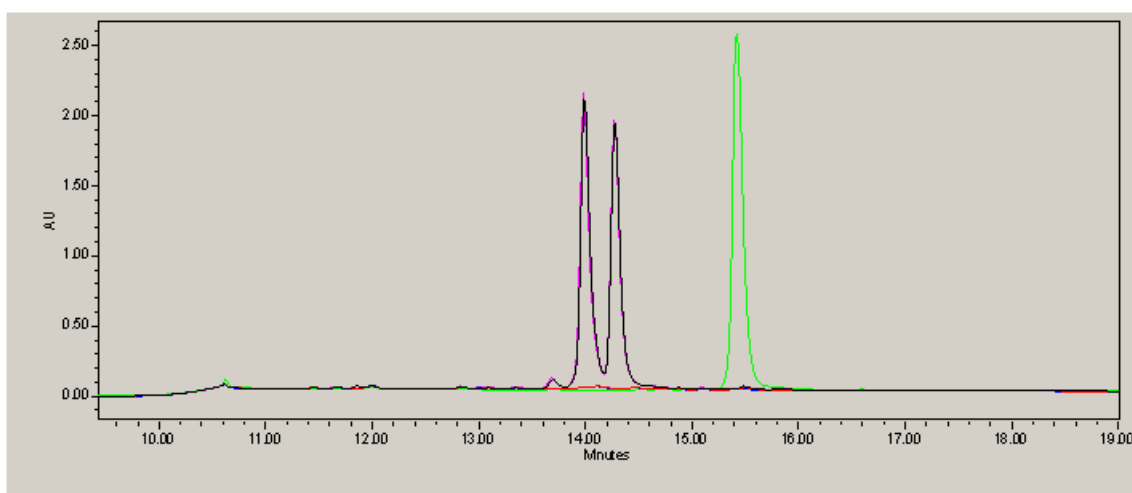
### 2.1 Estudio del péptido 13-mer

En primer lugar, se simuló una fase oral, donde el péptido entró en contacto con una solución de saliva a pH7 compuesta por lisozima y  $\alpha$ -amilasa durante 5min a 37°C. Tras 5min en agitación con dicha solución de enzimas y al pH de esta fase, se determinó el perfil peptídico presente al finalizar la misma, tomando un volumen de 300μL que fue analizado por HPLC, según el protocolo descrito en el apartado 7 de Material y Métodos. Tal como se observa en la Figura 74, el péptido 13-mer se mantuvo bastante estable a la largo de la fase oral.



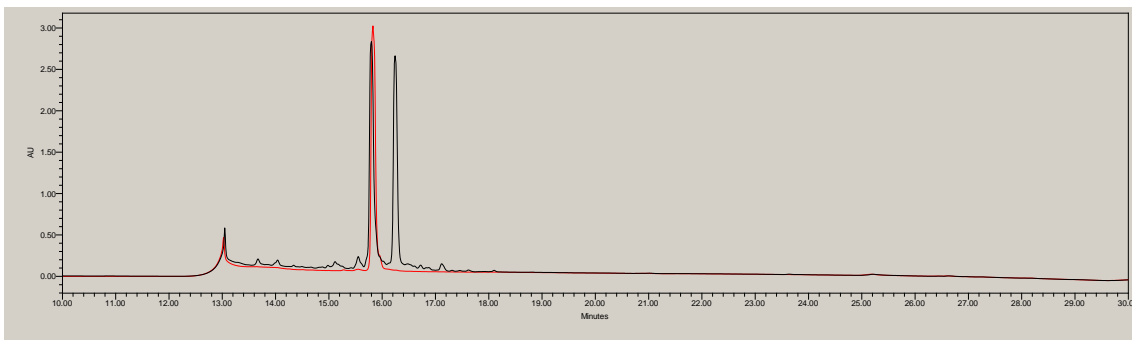
**Figura 74.** Cromatograma correspondiente al paso del péptido 13-mer por la fase oral (Rojo: blanco de enzima; Azul: Péptido 13-mer a tiempo 0; Negro: Péptido al final de la fase oral (5min)).

Trascurridos 5min de la fase oral, tras la cual se recuperó 98,6% del péptido, se adicionó a la solución de saliva el jugo gástrico (pH1,5) con seroalbúmina bovina, pepsina y mucina así como sales tales como NaCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , KCl,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . El péptido se mantuvo en contacto 2h a  $37^\circ\text{C}$  con esta solución y se extrajo muestra tanto a los 30min como a las 2h. Siguiendo el procedimiento anterior, se obtuvo una alícuota que contenía un volumen final de  $300\mu\text{L}$  y se cuantificó el contenido de péptido 13-mer presente en la muestra tanto a los 30min como a las 2h de estar sometido a las condiciones de la fase gástrica (Figura 75).



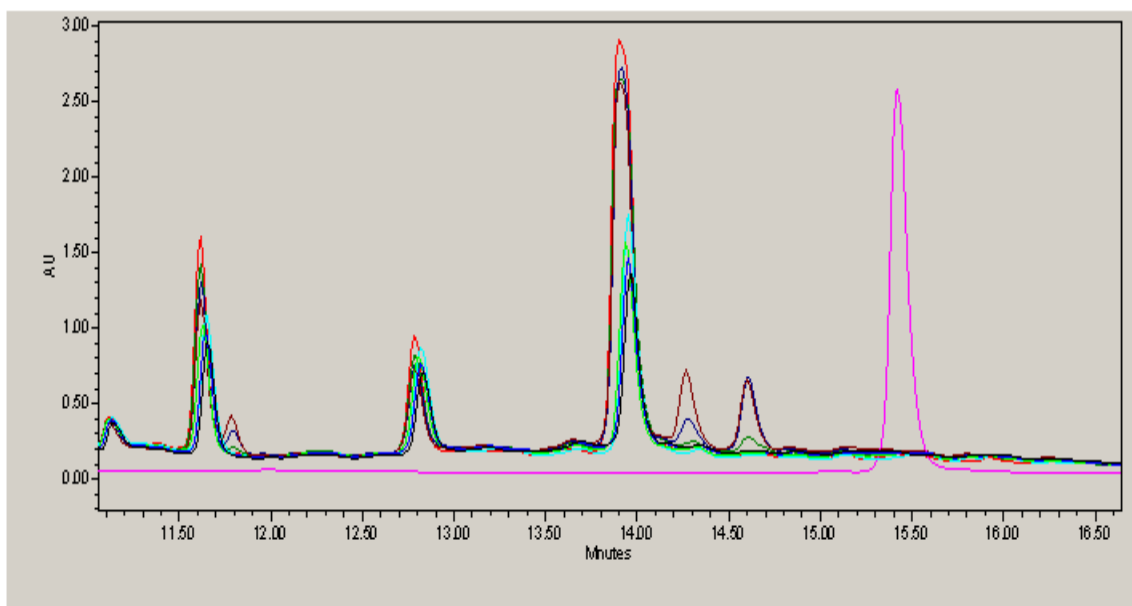
**Figura 75.** Cromatograma correspondiente al paso del péptido 13-mer por la fase gástrica (Rojo: blanco de enzima; Verde: Péptido 13-mer a tiempo 0; Rosa: Péptido 13-mer tras 30min en la fase gástrica; Negro: Péptido al final de la fase gástrica (2h)).

Los resultados cromatográficos indicaron que el péptido 13-mer se degrada completamente por la acción del pH y/o enzimas presentes en esta fase generándose dos péptidos a los 30min del proceso que se mantienen hasta el final del mismo (2h). Se identificaron los dos péptidos derivados del 13-mer (DNYDNSAGKWWVT) que resultaron ser el péptido 9-mer (NYDNSAGKW) y el péptido 10-mer (DNYDNSAGKW). Para comprobar estos resultados, se sintetizó químicamente el péptido 9-mer por ser más pequeño y por tener menor homología de secuencia con el péptido 13-mer y se superpuso el cromatograma obtenido junto con el del péptido 13-mer sometido a la fase gástrica (Figura 76).



**Figura 76.** Cromatograma conteniendo el péptido 13-mer sometido a la fase gástrica (negro) y el péptido 9-mer sintetizado (rojo).

Finalmente el péptido 13-mer que ya había superado la fase oral y gástrica, fue sometido a la fase intestinal donde se mantuvieron estables a menor concentración, los péptidos 9-mer y 10-mer que se habían generado en la fase gástrica (Figura 77).



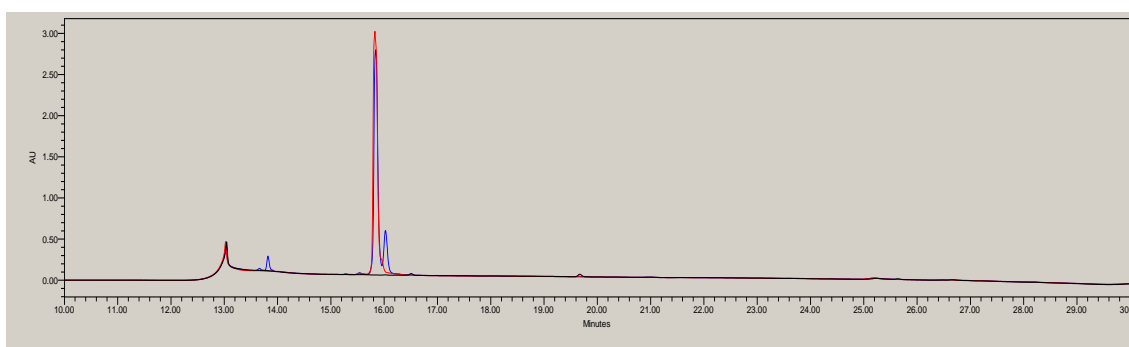
**Figura 77.** Cromatograma correspondiente al paso del péptido 13-mer por la fase intestinal (Negro: Blanco de enzima; Rosa: Péptido 13-mer a tiempo 0; Marrón: Péptido

13-mer tras 15min en la fase intestinal; Azul: Péptido 13-mer tras 30min en la fase intestinal; Verde: Péptido 13-mer tras 1h en la fase intestinal); Rojo: Péptido 13-mer al final de la fase intestinal (2h)).

En base a estos resultados, se evaluó la actividad del péptido 9-mer, tanto frente a la LP como a su estabilidad a lo largo del tracto digestivo.

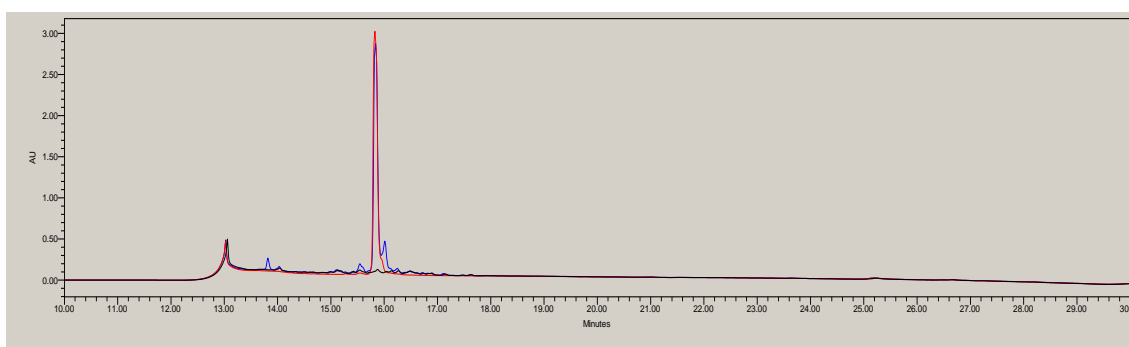
## 2.2. Estudio del péptido 9-mer

Con el objetivo de evaluar también la estabilidad del péptido funcional 9-mer en las condiciones de la digestión gastrointestinal, se simuló de nuevo la fase oral con este péptido puro (1,5 mg) disuelto en 25  $\mu$ L de DMSO entrando en contacto con una solución de saliva de 318,5  $\mu$ L tal como se describió para el péptido 13-mer (Figura 78).



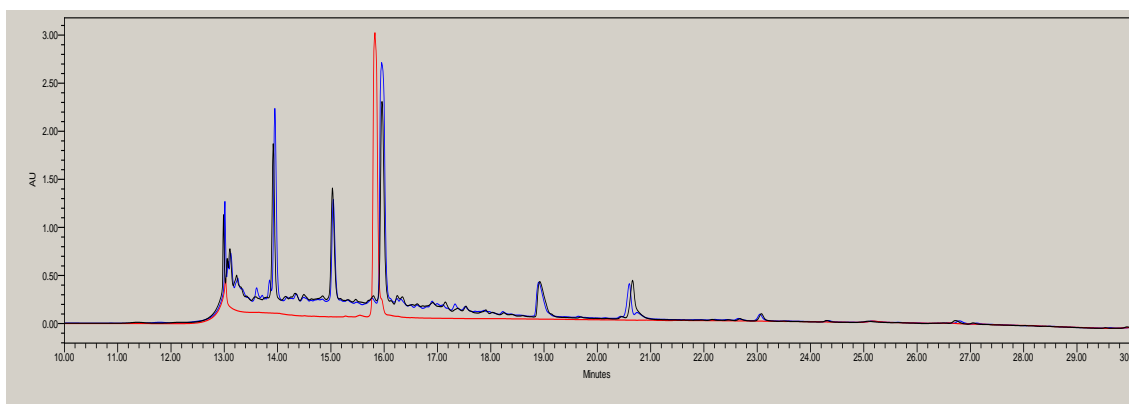
**Figura 78.** Cromatograma correspondiente al paso del péptido 9-mer por la fase oral (Negro: blanco de enzima; Rojo: Péptido 9-mer a tiempo 0; Azul: Péptido al final de la fase oral (5min)).

El péptido 9-mer se mantuvo totalmente estable a la largo de la fase oral y trascurridos 5min, se adicionó el jugo gástrico (pH1,5) siguiendo la misma metodología (Figura 79).



**Figura 79.** Cromatograma correspondiente al paso del péptido 9-mer por la fase gástrica (Negro: blanco de enzima; Rojo: Péptido 9-mer a tiempo 0; Azul: Péptido 9-mer al final de la fase gástrica (2h)).

Los resultados cromatográficos indicaron que el péptido 9-mer es estable a la acción del pH y/o enzimas presentes en esta fase. Finalmente el péptido fue sometido a la fase intestinal donde se degradó parcialmente (Figura 80).



**Figura 80.** Cromatograma correspondiente al paso del péptido 9-mer por la fase intestinal. (Negro: Blanco de enzima; Rojo: Péptido 9-mer a tiempo 0; Azul: Péptido 9-mer al final de la fase intestinal (2h)).

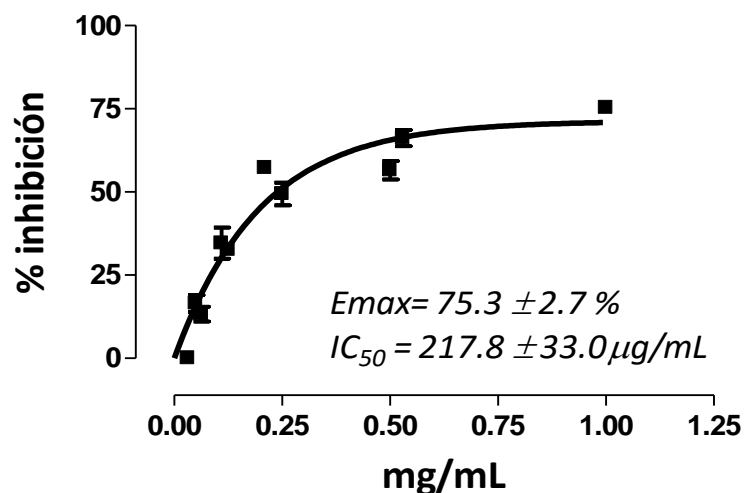
La Tabla 40 permite evaluar el porcentaje de degradación del péptido 9-mer a lo largo de todas las fases del tracto digestivo.

**Tabla 40.** Porcentaje de degradación del péptido 9-mer a lo largo de las distintas fases que simulan su paso por el tracto digestivo.

Fases del tracto Gastrointestinal	Tiempo (min)	Degradación 9-mer (%)
Fase Oral	5	0
Fase Gástrica	30	0
	120	0
	15	44,7
Fase Intestinal	30	47,2
	60	48,5
	120	51,2

A diferencia del 13-mer, el péptido 9-mer, obtenido de la degradación del primero, es más estable a las condiciones agresivas del tracto digestivo humano a las que se sometieron.

Posteriormente para evaluar su actividad funcional, se llevó a cabo el estudio de inhibición de la LP y los valores de  $E_{max}$  e  $IC_{50}$  se representan en la Figura 81.



**Figura 81.** Efecto de distintas concentraciones del péptido 9-mer sobre la actividad de la lipasa pancreática.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del % de inhibición respecto a la actividad LP de la muestra control ( $n = 3$ ).  $E_{max}$  = Inhibición máxima obtenida con la concentración mayor;  $IC_{50}$  = concentración del producto que inhibe el 50% de la actividad enzimática.

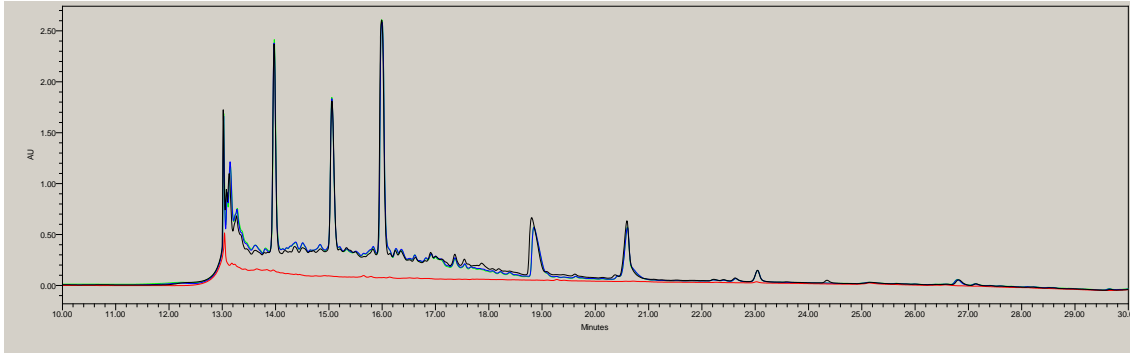
### 2.3. Estudio del hidrolizado proteico

Teniendo en cuenta que el proceso de obtención de un péptido puro por síntesis química es económicamente muy costoso y el péptido 13-mer se degrada a lo largo del tracto digestivo en los péptidos 9-mer y 10-mer, con el fin de poder manejar un producto tecnológicamente más accesible para la industria alimentaria, se sometió el hidrolizado proteico a las condiciones gastrointestinales.

Por ello se concentró el hidrolizado hasta un volumen 10 veces menor (10X) y se sometió a las condiciones del tracto gastrointestinal con el fin de poder identificar un cambio en el perfil peptídico al final de la fase intestinal y poder valorar la presencia o ausencia del péptido 13-mer y/o 9-mer.

No obstante, pese a partir de una muestra concentrada, no podemos sacar conclusiones de estos resultados ya que esta técnica no nos permite detectar cambios en el perfil de péptidos del hidrolizado al final de la fase intestinal. Por este motivo no se pudo cuantificar la presencia, en esta muestra, de los péptidos 13-mer y/o 9-mer y comprobar el posible efecto matriz que puede tener el hidrolizado respecto a los péptidos puros (Figura 82).





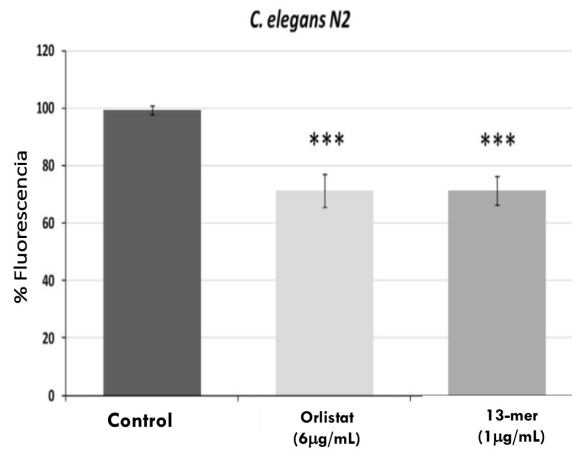
**Figura 82.** Cromatograma correspondiente al paso del hidrolizado proteico por la fase intestinal (Negro: Blanco de enzima; Rojo: Hidrolizado proteico a tiempo 0; Azul y verde: Hidrolizado proteico al final de la fase intestinal (2h)).

### 3. Evaluación funcional *in vivo* de los compuestos antiobesidad con *C.elegans*

A la vista de los resultados obtenidos hasta el momento, se decidió evaluar la actividad funcional de los péptidos puros 13-mer y 9-mer así como del hidrolizado del Barquillo en un modelo *in vivo*, que complementase los estudios *in vitro* sobre la actividad de la LP y que nos permitiera determinar la actividad sobre la regulación lipídica, pudiendo identificar algún efecto adicional a la inhibición de la LP. Para ello se seleccionó el nematodo *C.elegans* por ser un modelo muy adecuado para el estudio de la obesidad (Zheng J et al., 2012) ya que el metabolismo de lípidos es una vía muy bien conservada de la levadura a los seres humanos (Chiang SH et al., 2003) y se han identificado en *C.elegans* más de 300 genes relacionados con la reducción de grasa corporal. Concretamente se han encontrado genes implicados en la regulación de la función intestinal y en el apetito cuya inactivación mediante RNAi causa reducción de la obesidad o incremento del almacenamiento lipídico (Srinivasan S., 2015). Se trata de un modelo en el que es muy sencillo cuantificar la cantidad de grasa acumulada mediante una tinción con rojo de Nilo (Ashrafi K et al., 2003, McKay RM et al., 2003), por lo que se abordó este estudio donde también se trabajó con Orlistat como control positivo.

#### 3.1. Estudio del péptido 13-mer

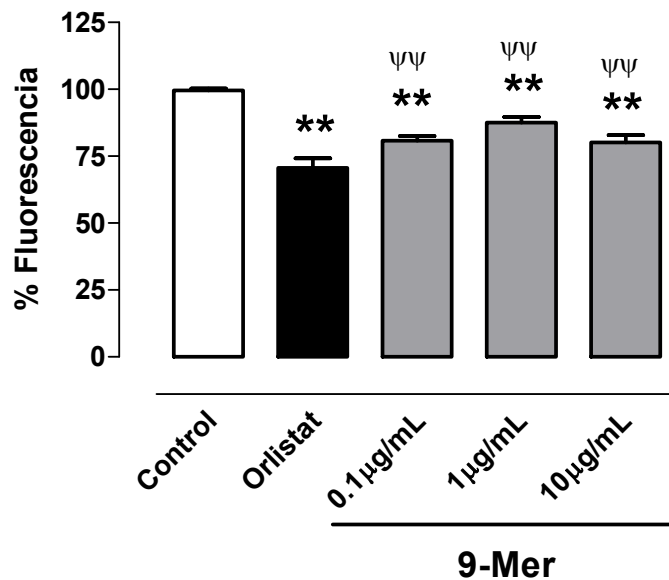
Para evaluar la actividad del péptido 13-mer *in vivo*, se administró 1µg/mL del péptido 13-mer durante cuatro días, a *C.elegans*, observándose la misma reducción de la fluorescencia que la obtenida cuando se administra una concentración de Orlistat de 6µg/mL (Figura 83). Estos resultados indican que el péptido 13-mer a una concentración de 1µg/mL es igual de eficaz en la reducción de grasa corporal que 6µg/mL de Orlistat.



**Figura 83.** Porcentaje de fluorescencia presente en las muestras analizadas con la cepa salvaje N2 en condiciones control, en presencia de Orlistat (6µg/mL) o en presencia de 13-mer (1µg/mL) (Figura tomada de Martorell P et al., 2013).

### 3.2. Estudio del péptido 9-mer

Se evaluó la capacidad del péptido 9-mer para reducir la grasa corporal en el modelo de *C. elegans* y para ello se administró este péptido, a una concentración de 1µg/mL durante 4 días a *C. elegans*, y se observó una reducción de la grasa corporal tras el consumo del péptido (Figura 84). No obstante, a diferencia de lo observado con el 13-mer, se observó un menor efecto en la acumulación de grasa que el obtenido con Orlistat, incluso a una concentración de 10 µg/mL, superior a la utilizada en el caso de Orlistat (6µg/mL).

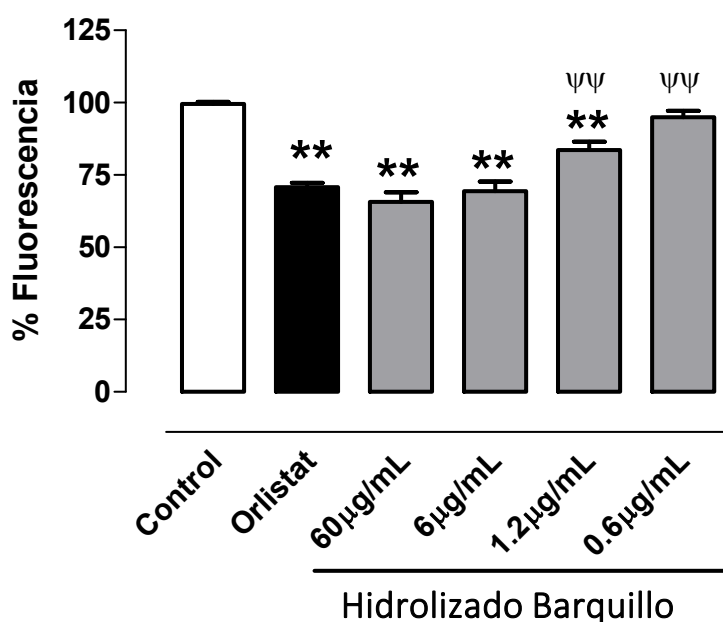


**Figura 84.** Porcentaje de fluorescencia presente en las muestras analizadas con la cepa salvaje N2 en condiciones control, en presencia de Orlistat (6µg/mL) o en presencia de 9-mer a concentraciones 0,1µg/mL, 1µg/mL y 10µg/mL (\*\*  $P < 0,01$  vs control, ΨΨ  $P < 0,01$  vs Orlistat).

### 3.3. Estudio del hidrolizado proteico

Para estudiar el efecto del hidrolizado proteico sobre la reducción de la grasa corporal en *C.elegans*, se testaron las concentraciones de 0,6 $\mu$ g/mL, 1,2 $\mu$ g/mL, 6 $\mu$ g/mL y 60 $\mu$ g/mL. Los datos obtenidos mostraron un claro efecto dosis respuesta, registrándose los porcentajes de fluorescencia de 94,92%, 83,66%, 69,42% y 65,68% respectivamente (Figura 85).

Estos resultados indicaron que, adicionando a la dieta habitual de *C.elegans* 60 $\mu$ g/mL o 6 $\mu$ g/mL del hidrolizado proteico, el porcentaje de fluorescencia fue similar al observado al adicionar Orlistat a la concentración 6 $\mu$ g/mL. Por tanto, aunque la actividad del hidrolizado proteico sobre la LP fue menor que la de Orlistat y la del péptido puro 13-mer, cuando se analiza su actividad *in vivo* en el modelo de *C. elegans*, su capacidad para inhibir la acumulación de grasa es similar al Orlistat y sólo ligeramente inferior al 13-mer. Considerando esta observación, podemos concluir que el hidrolizado puede tener un potencial industrial mayor que el del péptido puro, dada la simplicidad de su proceso de obtención a partir del Barquillo. El péptido 13-mer, algo más potente, requiere o bien su síntesis, o bien un procedimiento de purificación más largo y costoso lo que dificultaría su posible utilización a gran escala.



**Figura 85.** Porcentaje de fluorescencia presente en las muestras analizadas con la cepa salvaje N2 en condiciones control, en presencia de Orlistat (6 $\mu$ g/mL) o en presencia del hidrolizado proteico a las concentraciones 0,6 $\mu$ g/mL, 1,2 $\mu$ g/mL, 6 $\mu$ g/mL y 60 $\mu$ g/mL (\*\*  $P < 0,01$  vs control; ΨΨ  $P < 0,01$  vs Orlistat).

Por otra parte, si observamos los datos resumidos en la Tabla 41, en la que se compara la concentración necesaria para inhibir la acumulación de grasa *in vivo* a la necesaria para inhibir la LP *in vitro* observamos que en el caso del Orlistat, la concentración que inhibe la LP *in vitro* es claramente inferior a la necesaria *in vivo* para inhibir la acumulación de grasa en *C. elegans*. Sin embargo, con los péptidos puros y con el hidrolizado del Barquillo ocurre exactamente lo contrario, siendo necesarias concentraciones menores *in vivo* que *in vitro*. Esta diferencia se explicaría en el caso de que, además de la inhibición de la LP, tanto el hidrolizado como los péptidos estuviesen actuando *in vivo* sobre la acumulación de grasa, no solo inhibiendo la LP sino a través de algún mecanismo adicional.

**Tabla 41.** Resumen de los resultados obtenidos con los distintos productos sobre la inhibición de la lipasa pancreática y la acumulación de grasa en el modelo de *C. elegans*.

Compuesto	Inhibición Lipasa pancreática (IC <sub>50</sub> µg/mL)	Inhibición acumulación grasa (µg/mL)
Orlistat	0,0154	6 (~30% de reducción)
Hidrolizado proteico	1293	1.2 (~16% de reducción)
Péptido 13-mer	141	1 (~30% de reducción)
Péptido 9-mer	218	1 (~12% de reducción)

#### 3.4. Búsqueda de nuevas actividades del péptido 13-mer

Para tratar de identificar el mecanismo de actuación del 13-mer sobre el modelo *C. elegans*, se llevó a cabo una extracción del RNA del conjunto de nematodos alimentados con el péptido a 1µg/mL durante 3 días y se evaluaron los genes expresados comparándolos con un control que no recibió el péptido.

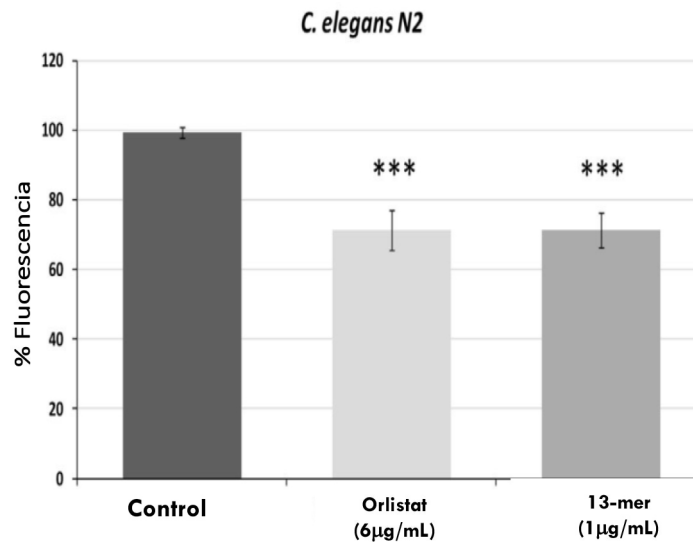
En cuatro replicas biológicas de *C. elegans* alimentado con el péptido 13-mer se identificaron los procesos metabólicos afectados tras el consumo del mismo. La Tabla 42 contiene los resultados obtenidos (Martorell P et al., 2013).

**Tabla 42.** Rutas sobreexpresadas en los nematodos alimentados con 1µg/mL de péptido 13-mer.

Gen ID	Descripción	Valor estadístico (P)
00620	Metabolismo del piruvato	0,002
00640	Metabolismo del propionato	0,004
00430	Formación del eje dorso ventral	0,004
00280	Degradación de valina, leucina e isoleucina	0,012
00650	Metabolismo del butanoato	0,02
00380	Metabolismo del triptófano	0,022
00450	Metabolismo del selenio	0,022
003050	Proteosoma	0,035
00900	Biosíntesis de terpenoides	0,04
00250	Metabolismo de la alanina, aspartato y glutamato	0,04
00910	Metabolismo del nitrógeno	0,04
00020	Ciclo del ácido tricarbóxico	0,049
00270	Metabolismo de la cisteína y metionina	0,049

A partir de estos resultados y en relación con la obesidad, podemos apreciar que el consumo del péptido 13-mer por *C.elegans* favorece, entre otras, la sobreexpresión del metabolismo del triptófano, precursor de la serotonina. Se trata de un neurotransmisor importante en el control del apetito y la saciedad (Bello NT et al., 2011; Blundell JE et al., 1986), por lo que la reducción de grasa observada en *C.elegans* tras el consumo del péptido 13-mer podría ser debida a un aumento en los niveles de serotonina y su consecuente efecto saciante en el nematodo.

Para corroborar que el efecto del péptido sobre el metabolismo del triptófano está implicado en la reducción de grasa observada por fluorescencia, se trabajó con la cepa mutante de *C.elegans* triptófano hidrolasa -/- (TPH-1). Los nematodos que presentaban una delección en este gen no sintetizan serotonina y acumulan grandes cantidades de grasa (Sze JY et al., 2000). En este caso, el consumo del péptido 13-mer por la cepa TPH-1 no produjo la reducción de la grasa corporal observada en la cepa silvestre N2, confirmando que el metabolismo del triptófano es un mecanismo de actuación esencial del péptido 13-mer (Figura 86).



**Figura 86.** Porcentaje de fluorescencia presente en las muestras analizadas con la cepa mutante *tph-1* en condiciones control, en presencia de Orlistat (6 µg/mL) o en presencia de 13-mer (1 µg/mL) (Figura tomada de Martorell P et al., 2013).

Además de este mecanismo, tras la ingesta por *C.elegans* del 13-mer se han identificado otros, de manera estadísticamente más significativa, que se han sobreexpresado, como el metabolismo del piruvato. Esto indica que el consumo del péptido 13-mer está activando el metabolismo de los carbohidratos y favoreciendo la liberación de energía y el gasto calórico a través del proceso de glucólisis. En este proceso, el piruvato sufre una descarboxilación oxidativa por la acción del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH), para producir acetyl-coA y posteriormente energía, en forma de ATP. Según hemos descrito previamente, el metabolismo del piruvato compite con la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, lo que podría reducir la formación de radicales libres responsables del estrés oxidativo (Liu et al., 2002) y justificar la capacidad antioxidante observada por el péptido 13-mer (Martorell P et al., 2013), aunque deberían llevarse a cabo estudios adicionales para comprobar esta actividad.

#### 4. Estudio de las interferencias entre compuestos para el diseño de un posible alimento funcional

##### 4.1. Selección del ingrediente funcional

A la vista de los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, y teniendo en cuenta que la revalorización de subproductos es una alternativa a nivel medioambiental más apropiada que el uso de productos obtenidos por síntesis química, se seleccionó el hidrolizado proteico para el posible diseño de un nuevo alimento funcional.

Con el objetivo de evaluar la posible interferencia entre los compuestos presentes en esta fracción y los ingredientes procedentes de la matriz sobre la que adicionarlos, se

seleccionó la fracción inferior a 3.000Da obtenida por ultrafiltración del Barquillo hidrolizado, conteniendo únicamente péptidos bioactivos de peso molecular inferior a 3.000Da.

En base a los resultados obtenidos del primer objetivo de este trabajo, se seleccionó un producto de cacao como matriz alimentaria con la que combinar los péptidos bioactivos, dado que los encuestados en la investigación de marketing valoraron, con una puntuación más alta en la escala de Likert, que el ingrediente funcional proviniera de la misma matriz alimentaria sobre la que se adiciona (Figura 56).

#### 4.2. Características de la matriz alimentaria a enriquecer

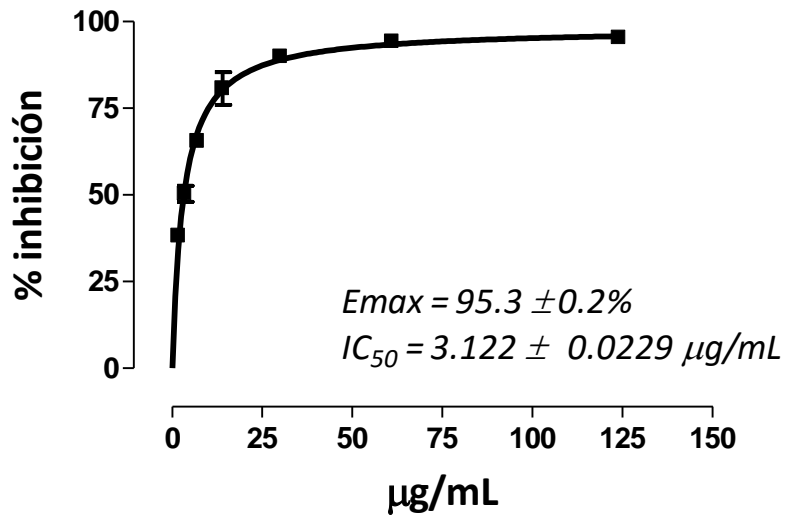
Entre los diferentes productos de cacao, se seleccionó aquel con un alto contenido en polifenoles para poder determinar si estos compuestos podían enmascarar o reducir la actividad determinada por los péptidos frente a la LP o, por el contrario, se podían combinar las propiedades antihipertensivas, antiinflamatorias, antioxidantes y antiobesidad asignadas a los polifenoles del cacao (Alif F et al., 2014), con las propiedades antiobesidad de los péptidos funcionales presentes en la fracción inferior a 3.000Da del hidrolizado proteico. Conociendo la relación entre la obesidad y la hipertensión, es fácil asumir que una corrección del sobrepeso será beneficioso en la reducción de cifras de tensión arterial y, por lo tanto, un producto con capacidad antihipertensiva y con efecto en la obesidad, podría destinarse a un público objetivo mayor. Esta reflexión nos llevó a seleccionar el producto CoccoanOX (CCX) ya que es un producto de cacao que presenta un alto contenido de epicatequina y catequina, mucho mayor que un cacao estándar. Además, diferentes estudios han demostrado un efecto antihipertensivo de este producto en ratas espontáneamente hipertensas (Quiñones M, et al., 2010; Cienfuegos-Jovellano E., 2009).

Por ello, se partió de dos muestras de CoccoanOX: CCX 45% (parcialmente soluble en agua) y CCX 45%ws (totalmente soluble en agua) que fueron evaluadas a nivel funcional.

En primer lugar, se evaluó el contenido polifenólico de estos productos siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.4.2 mostrando valores de 39,01% y 40,27% respectivamente. En segundo lugar se evaluó la capacidad de los sobrenadantes obtenidos tras preparar ambas muestras al 10% (p/v) y centrifugar durante 15min a 4.000rpm para inhibir la actividad de la LP.

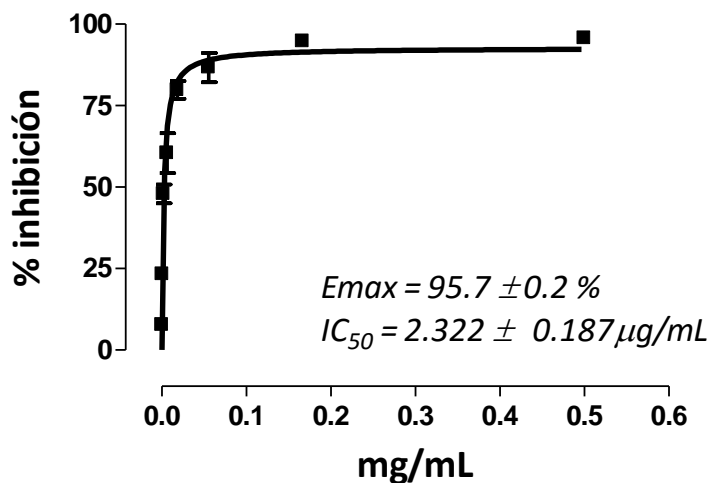
Tal como se observa en las Figuras 87 y 88, ambos productos son capaces de inhibir de forma concentración dependiente la LP, con un Emax semejante y una IC<sub>50</sub> significativamente menor ( $P = 0,0132$ ) en el caso del CCX 45%ws. Por ello y por su

facilidad de manejo, se seleccionó el CCX 45%ws para utilizarlo como matriz alimentaria.



**Figura 87.** Efecto de distintas concentraciones de CCX 45% sobre la inhibición de la lipasa pancreática.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del % de inhibición respecto a la actividad LP de la muestra control (n =3); Emax = Inhibición máxima obtenida con la concentración mayor; IC<sub>50</sub> = concentración del producto que inhibe el 50% de la actividad enzimática.



**Figura 88.** Efecto de distintas concentraciones de CCX 45%ws sobre la inhibición de la lipasa pancreática.

Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar del % de inhibición respecto a la actividad LP de la muestra control (n =3); Emax = Inhibición máxima obtenida con la concentración mayor; IC<sub>50</sub> = concentración del producto que inhibe el 50% de la actividad enzimática.



Antes de mezclar el CCX 45%ws con la fracción inferior a 3.000Da del hidrolizado proteico, se comprobó la ausencia de los péptidos 13-mer y 9-mer en el producto CCX 45%ws. Para ello, se llevó a cabo una purificación por HIC y se recogieron tres tipos de muestras (fracción no retenida, lavado y fracciones de elución). En todas ellas se cuantificó la cantidad de polifenoles totales y se evaluó la actividad de la LP observándose una relación lineal conforme aumenta el contenido en polifenoles (Tabla 43). Por otro lado, cada una de estas fracciones se analizó por MALDI-TOF comprobándose la ausencia de los péptidos 13-mer y 9-mer.

**Tabla 43.** Contenido polifenólico de las fracciones obtenidas tras la purificación del CCX 45%ws.

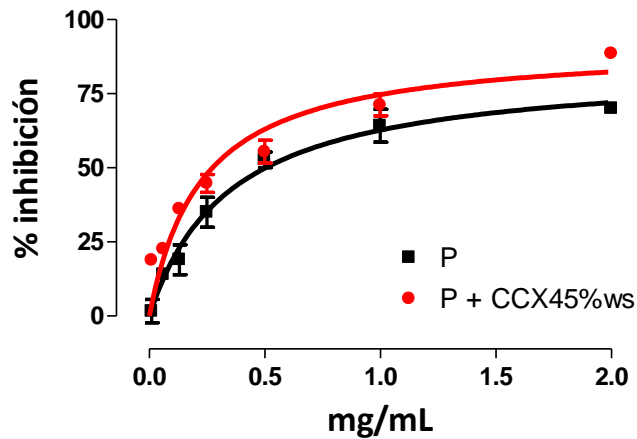
	Polifenoles (mg)	$\eta$ Rendimiento polifenoles	% inhibición LP
CCX 45%ws	2338,1,1	100,0	98,8 $\pm$ 0,4
No retenido	1730,5	74,01	89,7 $\pm$ 0,8
Lavado	477,5	20,42	70,1 $\pm$ 1,0
Fracciones elución	130,1	5,56	61,9 $\pm$ 2,7

Teniendo en cuenta que la combinación de péptidos y polifenoles puede anular la funcionalidad de alguno de los compuestos (Bourassa P et al., 2013), se estudió qué efecto podría tener la combinación de los polifenoles del cacao con los péptidos bioactivos del Barquillo sobre la actividad de la LP y para ello, se planteó analizar la actividad de un producto que contuviera CCX 45%ws y el hidrolizado del Barquillo. Para descartar una posible interferencia, seleccionamos en concreto la fracción inferior a 3.000Da del hidrolizado, donde se encuentran los péptidos activos anteriormente citados.

#### 4.3. Formulación y evaluación del producto obtenido

Como ejemplo de producto derivado de este trabajo, se prepararon, siguiendo la metodología descrita en el apartado 5, distintas muestras que contenían 1 $\mu$ g/mL de CCX 45%ws a las que se adicionaron diferentes concentraciones de la fracción inferior a 3.000Da del hidrolizado proteico del Barquillo (0,01mg/mL; 0,06mg/mL; 0,13mg/mL;

0,25mg/mL; 0,50mg/mL; 1mg/mL y 2mg/mL). La muestra resultante fue sometida a agitación y se utilizó en el ensayo de la LP (Figura 89 y Tabla 44).



**Figura 89.** Efecto de la combinación de distintas concentraciones de la fracción inferior a 3.000Da con 1µg/mL de CCX 45%ws sobre la inhibición de la lipasa pancreática.

Tal y como se muestra en la Tabla 44, la combinación de 1µg/mL de CCX45%ws y la fracción inferior a 3.000Da de péptidos bioactivos permite alcanzar un 88,6% de inhibición de la LP y reducir el valor de  $IC_{50}$  hasta 0,228mg/mL, indicando que no existe un efecto de enmascaramiento de los compuestos polifenólicos y proteicos en cuanto a su efectividad en la inhibición de PL, sino, por el contrario, se produce un efecto adictivo, al menos sobre la actividad de la LP. Quedaría por determinar si este efecto adictivo se observa también sobre la acumulación de grasa en el modelo de *C. elegans*.

**Tabla 44.** Valor de  $E_{max}$  e  $IC_{50}$  para la fracción de péptidos <3000Da del hidrolizado del Barquillo y la mezcla de dicha fracción con 1µg/mL de CCX 45%ws.

Producto	$E_{max}$ (%)	$IC_{50}$ (µg/mL)
Péptidos < 3000 Da	70,1 ± 3,5	347,5 ± 22,9
Péptidos < 3000 Da + CCX 45%ws	88,6 ± 2,1*	228,1 ± 41,4

\*  $P < 0.05$

A esto hay que añadir que los péptidos activos identificados en el presente trabajo se han encontrado también presentes, aunque en muy bajas concentraciones, en un

producto comercializado derivado del cacao (Martorell et al., 2013), lo que garantiza su estabilidad tras un proceso industrial.

Por todo ello, el reunir en un mismo producto comercial péptidos del Barquillo y polifenoles de CCX 45%ws tendría un potencial interés práctico, al utilizar un subproducto del cacao que contiene péptidos activos no solo sobre la LP sino sobre otros mecanismos que conducen a una menor acumulación de grasas. Este doble mecanismo de los péptidos, sumado al mecanismo sobre la LP de los polifenoles y a sus beneficios adicionales a otros niveles, justifica la preparación de distintos productos con el fin de su posible aplicación en la prevención/tratamiento de la obesidad y el riesgo cardiovascular.

En base a todo esto, se plantean diferentes alternativas para poder revalorizar el subproducto del cacao y dar una aplicación a estos resultados:

1. Por un lado, la obtención de un **ALIMENTO FUNCIONAL** a base de CCX 45%ws y péptidos del Barquillo con tamaño inferior a 3.000Da que permitan aprovechar el potencial de los polifenoles en inhibir la LP y la capacidad de los péptidos para producir saciedad. Se trataría de obtener un producto que combinara diferentes ingredientes bioactivos del cacao. Además, este producto, dadas las propiedades antihipertensivas adicionales del CCX podría ir dirigido hacia un target mayor y por lo tanto los marcadores a seguir en estudios con modelos superiores podrían ampliarse.
2. En segundo lugar se podría usar el hidrolizado proteico para formular un **COMPLEMENTO NUTRICIONAL** dirigido a usuarios con problemas de sobrepeso u obesidad.
3. En tercer lugar, la síntesis del péptido 13-mer para obtener un **FÁRMACO** capaz de actuar a través de un doble mecanismo, inhibición de la LP y activación del metabolismo del triptófano. En este caso, la utilidad del péptido puede dirigirse no sólo al control del sobrepeso u obesidad, sino a procesos en los que pueda resultar beneficioso un aumento en los niveles de serotonina. Es necesario señalar que en este último aspecto, los resultados del presente trabajo no son suficientemente concluyentes y serían necesarios análisis más exhaustivos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para confirmar el mecanismo de acción de dicho péptido.

## 5. Limitaciones y futuras líneas de trabajo

A lo largo de este trabajo se han pretendido identificar nuevos péptidos bioactivos en obesidad y detectar las necesidades insatisfechas del mercado para poder, en etapas posteriores, aplicar estos conocimientos adquiridos y obtener nuevos productos innovadores.

Con esta perspectiva, el curso de los estudios realizados y el alcance de los resultados obtenidos conducen a aseverar la importancia de utilizar fuentes alternativas para la obtención de nuevos alimentos funcionales, analizando tanto la innovación desde la óptica del cliente como la innovación desde la óptica de la tecnología.

Resta entonces remarcar algunas consideraciones, sobre el contexto donde se podría enmarcar esta tesis así como futuros trabajos que deberían llevarse a cabo para gestionar la innovación, del modo siguiente:

1. En las últimas décadas, se ha observado un crecimiento muy notable de la capacidad innovadora de los países, gracias tanto a las herramientas de las que dispone la ciencia a día de hoy como a la caída del coste de acceso a la información y a la tecnología. Recientemente, se ha hablado mucho sobre conocimiento e innovación como una prioridad clave para mejorar la economía de los próximos años. Todo proceso innovador que lleve asociada una investigación científica adquiere un impacto más significativo si va acompañado de una aplicación industrial. La abundancia de ideas prometedoras que se derivan de la I+D debe traducirse en la selección de servicios estratégicos, puesto que juegan un papel primordial en la creación y comercialización de nuevos productos y procesos (Metcalf S et al., 2000; Miles., 2001; Martínez-Fernández C. et al., 2006). Estos nuevos recursos podrán generar un modelo de negocio donde el éxito de la comercialización de una nueva tecnología estará vinculado tanto a la gestión de las incertidumbres técnicas como a las del mercado. Ello permite generar un contexto de aplicación que dará lugar a una mayor difusión del conocimiento, que vaya más allá del mercado y se convierta en un proceso socialmente distribuido (Gibbons M et al., 1994). En este caso, nos referimos a un conocimiento “robusto socialmente” que no sólo es valorado por una comunidad científica, sino también por comerciales y usuarios finales (Nowotny H et al., 2001). La gestión de la innovación va a implicar transferir el conocimiento adquirido a las fases de producción, distribución y uso a fin de generar rentabilidad sobre la inversión realizada. La explotación de los resultados obtenidos de la investigación incluirían el aseguramiento de la innovación, la

explotación de la innovación y la gestión del conocimiento. Esta última etapa conlleva la creación, codificación, transferencia y aplicación, y debe considerar tanto el conocimiento tácito (conocimiento subjetivo, personal) que resulta difícil de formular y de comunicar, como el explícito (de carácter más objetivo) que puede expresarse a través de un lenguaje formalizado, por lo que es posible su procesamiento, transmisión y almacenamiento, y es necesario que se lleve a cabo una aplicación real de lo transferido y que se materialice en forma de mejora, de nuevo proceso, o de nuevo producto.

Un nuevo producto que pudiera generarse de esta tesis doctoral debería tener unas características funcionales determinadas, un sistema de producción asequible e ir dirigido a un segmento de mercado específico.

En este sentido, la primera limitación del presente trabajo es la falta del escalado industrial en la obtención del hidrolizado proteico y de la fracción ultrafiltrada por 3.000Da así como la realización de estudios tanto a nivel de seguridad como de funcionalidad en modelos superiores de dichas muestras. También sería necesario, a la hora de gestionar esta innovación, definir un posible posicionamiento del producto o productos que se pudieran generar, una vez confirmados los resultados en estudios con modelo murino y estudios de intervención en humanos, en un segmento específico del mercado.

2. La optimización de la producción de hidrolizados enzimáticos de proteínas podría llevarse a cabo mediante la utilización de un reactor discontinuo de membrana que presenta como ventajas su flexibilidad, simplicidad de diseño y funcionamiento. Estos reactores no necesitan un sistema de control complejo y permiten trabajar a altas concentraciones de sustrato. No obstante, el coste de la mano de obra es elevado así como la variabilidad lote a lote, por lo que existen otras opciones como el empleo de reactores con enzimas inmovilizadas y reactores continuos de membranas. No obstante, hasta la fecha la aplicación industrial de estos dos sistemas de producción de hidrolizados enzimáticos de proteínas es muy limitada por el alto coste asociado a la inmovilización por parte del primero y los fenómenos de colmatación de las membranas, así como al paso de la enzima a través de la misma por parte del segundo (Sannier F et al., 1994). El modo de operación del reactor discontinuo de membranas consta de la sucesión de varios ciclos de hidrólisis y reutilización de la enzima y ha sido muy estudiada para la hidrólisis enzimática de diferentes sustratos como las proteínas del lactosuero (Gonzalez-Tello P et al., 1994ab; Margot A et al., 1997; Barros RM et al., 2004), del pescado (Guerard F et al., 2001), del salmón (Kristinsson HG et al., 2000) y del trigo (Kammoun R et al., 2003), terminando siendo procesos patentados en muchos casos (Schaefer C et al., 2003; Sorensen TL., 2004). En

este sentido, cabría optimizar las condiciones para abaratar costes en la producción industrial de nuestro ingrediente, definiendo los parámetros cinéticos tras ajustar las condiciones de procesos definidas, a escala de laboratorio, a un proceso industrial. Con este producto obtenido deberían determinarse la eficacia, estabilidad, biodisponibilidad y la seguridad del compuesto funcional y seleccionar la matriz adecuada para introducir el ingrediente y abordar estudios en modelos animales, tras los cuales definir los marcadores oportunos para poder determinar, en etapas posteriores, el efecto funcional de los compuestos en un estudio clínico randomizado, aleatorio doble ciego con el producto o ingrediente seleccionado. Teniendo en cuenta las recomendaciones de EFSA (EFSA Journal 2015) y basándonos en la capacidad saciante de uno de los péptidos presentes en el hidrolizado proteico (13-mer), nuestro producto podría ejercer un efecto sobre el apetito si se comprobase que: i) aumenta la saciedad o se reduce el hambre y por lo tanto se observa una reducción del peso corporal en humanos, ii) si los efectos son sostenidos durante el consumo del ingrediente.

3. Respecto a la gestión de la innovación, es muy importante deslumbrar desde el inicio las perspectivas comerciales para poder ofrecer un producto que el consumidor vaya a aceptar. A lo largo de los últimos años hemos podido observar cómo algunas empresas han desaparecido por no saber adaptarse a las condiciones del entorno, por no tener suficiente conocimiento de su mercado y, en definitiva, por no saber quiénes eran sus consumidores, que características poseían, como se comportaban y como evolucionaban. Dar una buena respuesta a las demandas de los consumidores finales aumenta las probabilidades de éxito dado que es el protagonista de la acción comercial. Al mismo tiempo que se debe analizar el mercado, se debe convertir el potencial tecnológico en valor económico y por lo tanto elaborar un modelo de negocio para potenciar la innovación. En este sentido, una vez enfocado el tipo de producto a elaborar, debería llevarse a cabo un estudio de marketing estratégico, describiendo bien el microentorno (la empresa, los proveedores, los intermedios de marketing, los competidores, los clientes) y del macroentorno (el entorno demográfico, el entorno económico, el entorno natural, el entorno tecnológico, el entorno político y social, el entorno cultural). Un aspecto fundamental en el marketing estratégico es la segmentación, basada en la división del mercado y la selección de cuál va a constituir el eje de actividad del negocio para conseguir un posicionamiento competitivo. Se puede segmentar teniendo en cuenta las actividades, intereses y opiniones de los consumidores para conseguir ser líder en ese segmento y orientar mejor la comunicación de marketing. Existen diferentes estrategias y criterios de segmentación en función de variables geográficas, actitud de compra, estilo de vida y el segmento elegido será aquel

que permita identificar alguna característica diferencial y que resulte financieramente atractivo. En este trabajo la obtención de un hidrolizado proteico funcional y la fracción inferior a 3.000Da, a partir de un subproducto de la industria alimentaria genera una ventaja competitiva que favorecerá un mejor posicionamiento y permitirá utilizar las herramientas de marketing de cara al consumidor. En base a los resultados de este trabajo, el público objetivo al que se deberá dirigir la investigación serán aquellas personas que se preocupan por su alimentación y por su salud, valoran significativamente el medio ambiente y consumen productos derivados del cacao habitualmente. Cabría pues delimitar un conjunto de consumidores para poder decidir en qué atributos tecnológicos se pondrá el énfasis durante la etapa de desarrollo y este podría ser las mujeres entre 30 y 50 años, siendo el grupo poblacional que más consume chocolate o derivados del cacao (Mercasa., 2014) y a su vez el que más consume productos de control de peso corporal (Childs NM., 1997). Esta selección nos permitirá enfocar con más precisión los estudios científicos que se deberían de abordar para demostrar el efecto del producto definido en esta población, así como el formato más adecuado y las características del producto que debería elaborarse en base a la demanda y a las expectativas de este público objetivo.





# CONCLUSIONES



1. La investigación de marketing, enfocada como el primer objetivo de este trabajo, ha permitido analizar los hábitos y el comportamiento de compra del consumidor, a partir de una muestra heterogénea con profesionales y no profesionales de la salud, de ambos sexos, distintas edades, situaciones profesionales, rentas y valores de IMC. Los valores más bajos de IMC se observaron en las mujeres jóvenes, hasta 50 años y con una renta en la media o por debajo de ella, mientras que aquellas personas con IMC superior a 25 fueron principalmente hombres con 50 años o más con unos ingresos por encima de la media. Esta muestra analizada considera que la alimentación es importante para la salud (91,3%), así como la práctica de ejercicio físico ocasionalmente (51%) o varias veces a la semana (41,3%) y la realización de dieta en algún periodo de su vida (56,7%).
2. Más de la mitad de la muestra analizada (57,2%) ha consumido productos para el control de peso corporal, siendo la mujer entre 30-50 años de edad y con una renta por encima de la media, la principal consumidora de los mismos. Los productos más consumidos son los alimentos funcionales (58,8%) seguido de los complementos nutricionales (50,5%) o medicamentos (10,1%) aunque se ha observado una relación en el consumo simultáneo de estos tres tipos de producto.
3. Las características que el consumidor más valora de los productos de control de peso guardan relación con las funcionalidades del producto (evidencia científica y etiquetado). Respecto a la prescripción médica o por parte de un profesional reconocido, únicamente fue apreciada por un 21,9% de los participantes y el punto de venta más valorado por los encuestados para la compra de estos productos es la farmacia.
4. El formato de producto mejor valorado tanto por el consumidor como por el no consumidor es el alimento funcional (83,9%), preferiblemente enriquecido con un ingrediente funcional que provenga del mismo alimento, frente al complemento nutricional (16,1%) y está dispuesto a pagar más por un producto de alto valor añadido. Generalmente el consumidor espera una mayor oferta de estos productos y el grado de satisfacción respecto a los existentes actualmente es muy bajo.
5. El análisis de los no consumidores de productos de control de peso, reveló que la principal razón de no consumir estos productos es la ausencia de necesidad de controlar el peso (48,3%), la falta de credibilidad en la eficacia de estos productos (37,1%) y la falta de información presente en los mismos (23,6%).
6. Respecto a la preferencia de producto para la elaboración de un alimento funcional para el control de peso, tanto los consumidores como los no

- consumidores, prefieren un derivado lácteo o zumo y, como alimento, su preferencia de compra se inclina hacia las galletas o productos derivados del cacao.
7. La investigación científica enfocada como segundo objetivo de este trabajo, y basada en la búsqueda de nuevos ingredientes bioactivos en obesidad, ha permitido obtener un hidrolizado proteico rico en péptidos funcionales, a partir de un subproducto del cacao, tras un tratamiento enzimático capaz de inhibir la lipasa pancreática *in vitro* y reducir la grasa corporal en un modelo animal *in vivo*.
  8. El proceso de purificación del hidrolizado, basado en una cromatografía de interacción hidrofóbica y una cromatografía de fase inversa, ha permitido identificar un péptido de 13 aminoácidos (13-mer) capaz de inhibir la LP *in vitro*. Tanto el hidrolizado como el péptido 13-mer identificado, inhiben la LP con menor potencia que el compuesto de referencia Orlistat pero reducen la grasa corporal *in vivo* a una concentración inferior a la del Orlistat.
  9. El análisis transcriptómico del péptido 13-mer, ha revelado que el consumo del péptido por el nematodo *C.elegans* sobreexpresa el metabolismo del triptófano, precursor de la serotonina. El análisis del péptido con la cepa tph-1 que no expresa serotonina, no produjo ningún efecto en la reducción de la grasa corporal por lo que nuestros resultados parecen indicar que el péptido podría estar actuando a través de esta vía.
  10. El proceso de digestión gastrointestinal del péptido 13-mer demuestra que el péptido es estable a lo largo de la fase oral, pero se degrada en los péptidos 10-mer (DNYDNSAGKW) y 9-mer (NYDNSAGKW) en la fase gástrica. Casi la mitad del péptido 9-mer se recupera al final de la fase intestinal y es capaz de reducir la grasa corporal en *C.elegans* e inhibir la LP *in vitro*.
  11. La combinación de la fracción de péptidos inferior a 3.000Da, obtenida tras la hidrólisis del subproducto del cacao, con un producto comercial rico en polifenoles (CCX 45%ws) podría ser una alternativa para la formulación de un nuevo producto que combinara el efecto identificado en este trabajo asociado a los péptidos y los múltiples efectos funcionales de los polifenoles del cacao.

# ANEXOS



## ANEXO 1



Salir de esta encuesta

### Hábitos de alimentación y control de peso

#### Introducción

Estimado amigo,  
El objetivo de la presente encuesta es recopilar información para llevar a cabo un proyecto de investigación académico sobre alimentación y salud. Todas las respuestas aportadas serán tratadas de forma totalmente anónima.  
Reiterando nuestro agradecimiento por su colaboración, reciba un cordial y afectuoso saludo.



Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)



Salir de esta encuesta

### Hábitos de alimentación y control de peso

#### Alimentación y control de peso

**\*1. ¿Es importante para usted cuidar su alimentación?**

- Sí, me preocupo por tener una alimentación equilibrada y saludable.
- No, no presto una atención especial al tipo de alimentación que sigo.

**\*2. ¿Realiza usted algún tipo de deporte o ejercicio físico?**

- No hago ejercicio.
- Hago alguna actividad física o deportiva ocasional (caminar o pasear, bicicleta, jardinería, gimnasia suave ...).
- Hago entrenamiento deportivo o físico varias veces a la semana.

**\*3. ¿Alguna vez ha seguido una dieta o régimen especial?.**

- No, nunca he hecho una dieta.
- Sí, en alguna ocasión puntual.
- Sí, hago dieta frecuentemente.



Ant.

Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Demanda de productos de control de peso

Actualmente existen en el mercado diferentes tipos de productos que ayudan a controlar, prevenir y/o reducir la aparición de obesidad y permitir controlar el peso. Observe las imágenes y las descripciones que le presentamos a continuación y conteste la pregunta que aparece seguidamente.

#### FÁRMACOS

Producto de prescripción médica que se encuentra generalmente en farmacia.



#### COMPLEMENTO NUTRICIONAL

Es un producto en forma farmacéutica (cápsula, comprimido, tableta, sobre, líquido...) con nutrientes (vitaminas, minerales, aminoácidos...), fitoquímicos o extractos de plantas, cuya finalidad es complementar la alimentación y generalmente se adquiere en parafarmacias, farmacias, herboristerías, supermercados y/o grandes superficies sin prescripción médica.



#### ALIMENTO FUNCIONAL

Alimento que, además de cubrir las necesidades nutricionales, ejerce un efecto beneficioso en la salud. Se encuentra generalmente en farmacias, parafarmacias, supermercados o grandes superficies.



\*4. Considerando pues los fármacos, los complementos nutricionales y los alimentos funcionales, ¿Podría indicar si ha consumido alguna vez algún producto de este tipo?

- No nunca he probado ninguno de estos productos.
- Sí, en alguna ocasión puntual.
- Sí, tomo alguno de estos productos con frecuencia.

17%

Ant. Sig.



## CONSUMIDORES DE PRODUCTOS DE CONTROL DE PESO



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

### Hábitos de alimentación y control de peso

#### Demanda de productos de control de peso

A continuación, le preguntaremos específicamente por cada uno de los productos descritos con anterioridad. Especifique si los consume o no y su frecuencia contestando a la pregunta que se plantea después de cada descripción.

##### FÁRMACOS

Producto de prescripción médica que se encuentra generalmente en farmacia.



\*6. ¿Ha consumido alguna vez medicamentos para controlar su peso corporal?

- Sí, en alguna ocasión puntual  
 Sí, tomo estos productos con frecuencia  
 No, nunca he probado este tipo de productos

21%

Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

### Hábitos de alimentación y control de peso

#### Demanda de productos de control de peso

##### COMPLEMENTO NUTRICIONAL

Es un producto en forma farmacéutica (cápsula, comprimido, tableta, sobre, líquido...) con nutrientes (vitaminas, minerales, aminoácidos...), fitoquímicos o extractos de plantas, cuya finalidad es complementar la alimentación y generalmente se adquiere en parafarmacias, farmacias, herboristerías, supermercados y/o grandes superficies sin prescripción médica.



\*7. ¿Ha consumido alguna vez complementos nutricionales para controlar su peso corporal?

- Sí, en alguna ocasión puntual  
 Sí, tomo estos productos con frecuencia  
 No, nunca he probado este tipo de productos

25%

Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Demanda de productos de control de peso

#### ALIMENTO FUNCIONAL

Alimento que, además de cubrir las necesidades nutricionales, ejerce un efecto beneficioso en la salud. Se encuentra generalmente en farmacias, parafarmacias, supermercados o grandes superficies.



\* 8. ¿Ha consumido alguna vez alimentos funcionales para prevenir la obesidad?

- Sí, en alguna ocasión puntual
- Sí, tomo estos productos con frecuencia
- No, nunca he probado este tipo de productos



Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

\* 9. ¿Quién le prescribió o recomendó el último producto para el control de peso que ha tomado?

- Médico.
- Farmacéutico o profesional sanitario no médico.
- Familiar.
- Amigo.
- Nadie.

Otro (especifique quien)

\* 10. Indique su grado de satisfacción con el último producto de control de peso que ha consumido.

- 1. En absoluto satisfecho
- 2.
- 3.
- 4.
- 5.
- 6.
- 7. Totalmente satisfecho.



Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

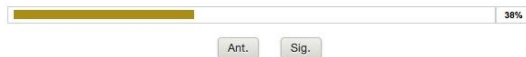
### Oferta de productos de control de peso

\*11. A continuación, se presentan una serie de características relacionadas con los productos de control de peso corporal. Por favor señale el grado de importancia que tiene para usted cada una de ellas.

	En absoluto importante	Nada importante	Poco importante	Indiferente	Algo importante	Bastante importante	Muy importante
Que se venda en farmacias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Que se venda en supermercados	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Que se venda en herboristería o centros de dietética	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Que se venda por Internet	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Que tenga una efectividad científicamente demostrada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Que el producto tenga un buen etiquetado	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

\*12. ¿Qué tipo de producto preferiría consumir para controlar el peso corporal?

- Un alimento funcional que además de cubrir las necesidades nutricionales previene la aparición de enfermedades.
- Un complemento nutricional en forma de cápsulas o sobres.



Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Alimentos funcionales

\*13. ¿Estaría dispuesto a pagar más por un alimento enriquecido en un principio activo que previniera la obesidad?.  
Un principio activo es un ingrediente o componente que tiene un efecto en la salud y se adiciona al alimento para dotarlo de propiedades funcionales

- Sí.
- No.

\*14. ¿Le gustaría que hubiese más oferta de este tipo de alimentos?

- Sí.
- No.
- Indiferente.



Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Desarrollo de alimentos funcionales

A continuación se le plantearán dos afirmaciones, indique en qué medida son importantes para usted, contestando en cada caso desde "En absoluto importante" hasta "Muy importante".

**\* 15.** Que el alimento funcional se obtenga por la adición de alguna sustancia que el propio alimento ya contiene hasta niveles adecuados que tengan un efecto benéfico (suplementación con vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos, fibras...).

1. En absoluto importante.  2.  3.  4.  5.  6.  7. Muy importante.

**\* 16.** Que el alimento funcional se obtenga por la introducción de un ingrediente funcional que normalmente el alimento no contiene a niveles adecuados para que tenga efectos beneficiosos (por ejemplo enriquecimiento de un yogur o una leche con omega 3).

1. En absoluto  2.  3.  4.  5.  6.  7. Muy

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Posibles alimentos funcionales

**\* 17.** A continuación se presentan varios productos en los que podría incorporarse un principio activo para prevenir la obesidad. ¿En qué productos preferiría consumirlo? (indique un máximo de tres)

- Pescado.
- Carne.
- Chocolate, cacao y sucedáneos.
- Zumo y/o néctar.
- Derivados lácteos.
- Galletas y pastelería.
- Pasta.



Ant.

Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Formato derivado lácteo

\*18. En caso de ofrecerle los productos en forma de derivado lácteo, indique en qué formato preferiría consumir el derivado lácteo que incorpore un principio activo.

- Postres con leche (natillas, flanes, mousse).
- Batido.
- Yogur.
- Leche.
- Queso.
- Helado.



Ant.

Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Formato chocolate, cacao y sucedáneos

\*19. En caso de que se le ofreciera un producto de este tipo en forma de derivado de chocolate o cacao, indique en qué formato preferiría consumir el chocolate o cacao que incorpore un principio activo.

- Tableta de chocolate.
- Turrón.
- Batido de chocolate.
- Bombón.
- Cacao soluble.
- Crema de untar.
- Snacks.



Ant.

Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)

## NO CONSUMIDORES DE PRODUCTOS DE CONTROL DE PESO



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Sair de esta encuesta

### Hábitos de alimentación y control de peso

#### Oferta de productos de control de peso

**\* 5. Por favor, indique el motivo de no consumir productos de control de peso corporal (puede indicar más de uno).**

- No necesito controlar mi peso.
- Creo que estos productos tienen un precio elevado.
- No creo en la efectividad de los productos que existen en el mercado.
- No me gusta el sabor o los formatos disponibles.
- No encuentro en el mercado productos que se ajustan a mis necesidades para controlar el peso.
- No tengo suficiente información sobre estos productos.

Otro (especifique)

**\* 6. ¿En qué medida cree usted que consumiría este tipo de productos de control de peso corporal si tuvieran las siguientes características?**

	Seguro que no los consumiría	Bastante improbable que los consumiera	Algo improbable	Indiferente	Algo probable	Bastante probable que los consumiera	Seguro que si los consumiría
Si se vendieran en farmacias	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Si se vendieran en supermercados	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Si se vendieran en herboristerías y centros de dietética	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Si se vendieran por Internet	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Si tuvieran una efectividad científicamente demostrada	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Si tuviera más información acerca del producto	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

**7. Si alguna vez decidiera consumir estos productos, ¿Cuál de las siguientes opciones preferiría?**

- Un alimento funcional que además de cubrir las necesidades nutricionales previene la aparición de enfermedades.
- Un complemento nutricional en forma de cápsulas o sobres.



Ant.

Sig.



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Alimentos funcionales

\*8. ¿Estaría dispuesto a pagar más por un alimento enriquecido en un principio activo que previniera la obesidad?. Un principio activo es un ingrediente o componente que tiene un efecto en la salud y se adiciona al alimento para dotarlo de propiedades funcionales

- Sí.  
 No.

\*9. ¿Le gustaría que hubiese más oferta de este tipo de alimentos?

- Sí.  
 No.  
 Indiferente.



Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Desarrollo de alimentos funcionales

A continuación se le plantearán dos afirmaciones, indique en qué medida son importantes para usted, contestando en cada caso desde "En absoluto importante" hasta "Muy importante".

\*10. Que el alimento funcional se obtenga por la adición de alguna sustancia que el propio alimento ya contiene hasta niveles adecuados que tengan un efecto benéfico (suplementación con vitaminas, minerales, proteínas, aminoácidos, fibras...).

1. En absoluto importante.  2.  3.  4.  5.  6.  7. Muy importante.

\*11. Que el alimento funcional se obtenga por la introducción de un ingrediente funcional que normalmente el alimento no contiene a niveles adecuados para que tenga efectos beneficiosos (por ejemplo, enriquecimiento de un yogur o una leche con omega 3).

1. En absoluto importante.  2.  3.  4.  5.  6.  7. Muy importante.



Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Posibles alimentos funcionales

**\* 12.** A continuación se presentan varios productos en los que podría incorporarse un principio activo para prevenir la obesidad. ¿En qué productos preferiría consumirlo? (indique un máximo de tres)

- Carne.
- Derivados lácteos.
- Galletas y pastelería.
- Pescado.
- Zumo y/o néctar.
- Chocolate, cacao y sucedáneos.
- Pasta.



Ant. Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Formato derivado lácteo

**\* 13.** En caso de ofrecerle los productos en forma de derivado lácteo, indique en qué formato preferiría consumir el derivado lácteo que incorpore un principio activo.

- Queso.
- Leche.
- Yogur.
- Postres con leche (natillas, flanes, mousse).
- Helado.
- Batido.



Ant. Sig.





VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Formato chocolate, cacao y sucedáneos

**\* 14.** En caso de que se le ofreciera un producto de este tipo en forma de derivado de chocolate o cacao, indique en qué formato preferiría consumir el chocolate o cacao que incorpore un principio activo.

- Bombón.
- Snacks.
- Tableta de chocolate.
- Cacao soluble.
- Crema de untar.
- Turrón.
- Batido de chocolate.



Ant.

Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!

## CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS



UNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

### Hábitos de alimentación y control de peso

#### Características demográficas

\*15. Indique su sexo

- Hombre  
 Mujer

16. Indique el tramo de edad al que pertenece

- Menos de 18 años  
 Entre 18 y 25 años  
 Entre 26 y 30 años  
 Entre 31 y 40 años  
 Entre 41 y 50 años  
 Entre 51 y 60 años  
 Entre 61 y 70 años  
 Más de 70 años

17. Indique su peso aproximado en Kilogramos

Kilogramos de peso

18. Indique su altura (ej: 1,75)



Ant.

Sig.



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Otros

#### 19. Indique su país de nacimiento

- España.
- Otros países.

#### 20. Indique su nivel educativo

- Sin estudios
- Estudios Básicos/ Primaria
- Estudios secundarios
- Estudios universitarios

#### 21. Indique su situación profesional actual

- Trabajando por cuenta propia.
- Trabajando por cuenta ajena.
- Labores del hogar.
- En desempleo.
- Jubilado/a o prejubilado/a.
- Incapacitado para trabajar.

Otro (especifique)

#### \*22. ¿Es usted un profesional relacionado con el sector de la alimentación y la nutrición?

- Sí.
- No.



Ant.

Sig.



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

### Otros

23. Según diferentes estadísticas, los ingresos medios por hogar en España se sitúan en torno a 1800 euros mensuales. Considerando este dato ¿En qué situación se posicionaría usted en cuanto a ingresos en su hogar?

- Muy por debajo de la media.
- Por debajo de la media.
- Alrededor de la media.
- Por encima de la media.
- Muy por encima de la media.



Ant.

Sig.

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)



VNIVERSITAT  
D VALÈNCIA

Salir de esta encuesta

## Hábitos de alimentación y control de peso

Sus opiniones son enormemente valiosas para nuestra investigación. Muchas gracias por su amable colaboración y por el tiempo dedicado a completar la encuesta.



Ant.

Listo

Desarrollado por SurveyMonkey  
[¡Cree su propia encuesta gratuita en línea ahora!](#)

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

---

<b>Product Name</b>	1 hoshi
<b>Order ID</b>	79919_1
<b>Lot No.</b>	79919001100109LQ
<b>Sequence</b>	DNYDNSAGKWWVT
<b>Modification</b>	N/A
<b>Length</b>	13AA
<b>Storage</b>	-20°C

---

---

<b>Test Items</b>	<b>Specifications</b>	<b>Results</b>
<b>Molecular Weight</b>	Theoretical MW:1555.61	Consistent
<b>HPLC purity</b>	>95%	97.9%
<b>Appearance</b>	White lyophilized powder	Conforms
<b>Quantity</b>	80-100 mg	100mg

---

**Caution:**

For laboratory or further manufacturing use only. Not intended for household use. If you have any questions about the Certificate of Analysis, please contact our customer service representative at 1-877-436-7274 (Toll-Free), or 1-732-885-9188.

Certified by: *Catherine* Date: 2009-10-14

Quality Assurance Department

Sample Name : I hoshi

Lot No. : 79919001100109LQ

Pump A : 0.065% trifluoroacetic in 100% water

Pump B : 0.05% trifluoroacetic in 100% acetonitrile

Total Flow:1 ml/min

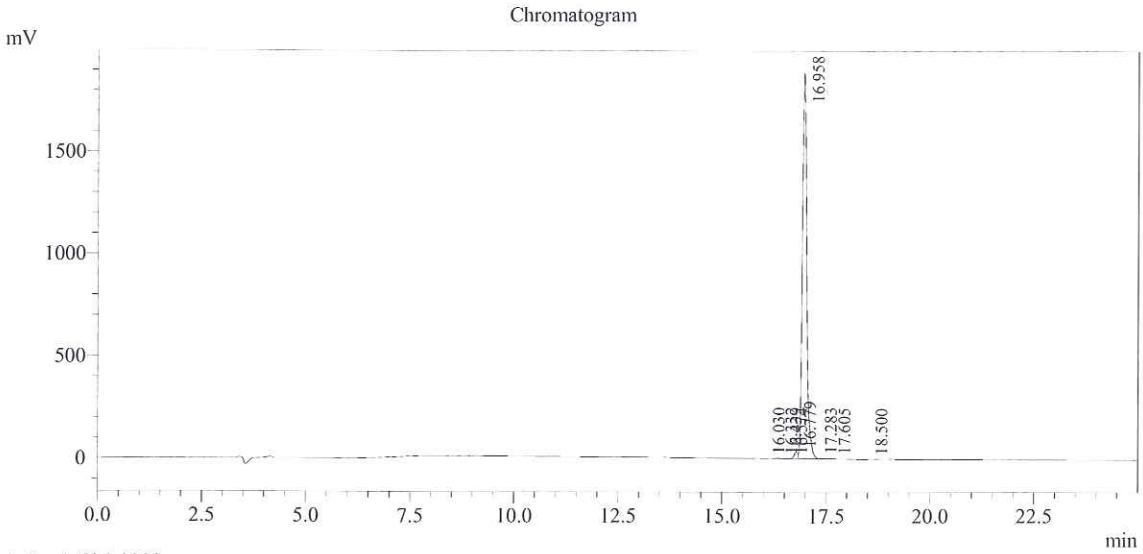
Wavelength:220 nm

Time	Unit	Command	Value	Comment
0.01	Pumps	Pump A B.Conc	5	
25.00	Pumps	Pump A B.Conc	65	
25.01	Pumps	Pump A B.Conc	95	
35.00	Pumps	Pump A B.Conc	95	
35.01	Pumps	Pump A B.Conc	5	
45.00	Pumps	Pump A B.Conc	5	
45.01	Controller	Stop		

<<Column Performance>>

<Detector A>

Column : AlltimaTM C18 4.6 x 250 mm

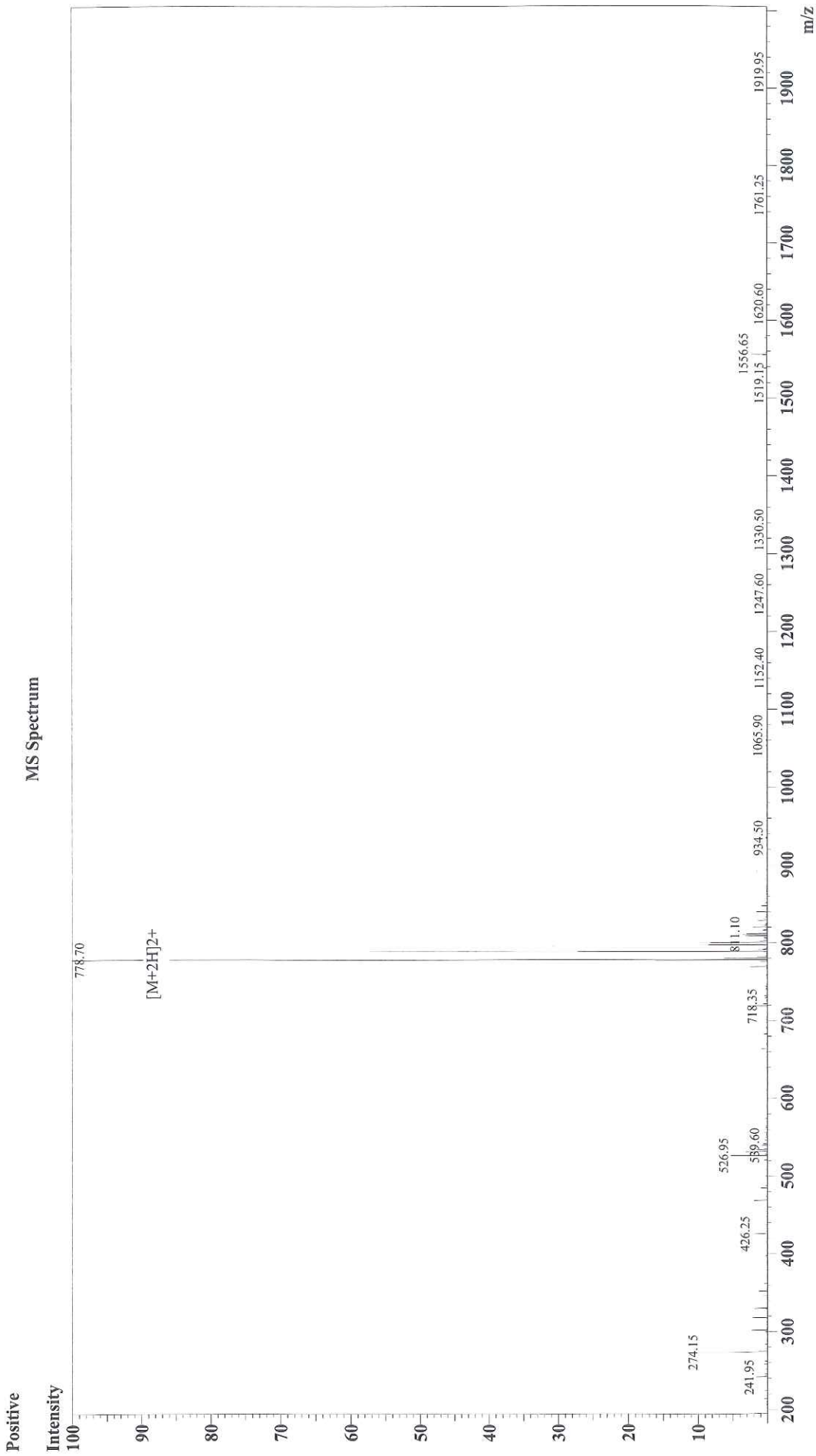


Peak Table

Detector A Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	16.030	8273	1345	0.058
2	16.332	22019	2445	0.156
3	16.439	10814	1891	0.076
4	16.574	11272	1948	0.080
5	16.779	204884	33855	1.447
6	16.958	13854363	1883325	97.858
7	17.283	33812	4205	0.239
8	17.605	8415	909	0.059
9	18.500	3824	398	0.027
Total		14157678	1930322	100.000

MS Spectrum



Sample Information  
User : Grace  
Date Acquired : 10/11/2009 15:25:35  
Sample Name : 1 hoshi  
Lot Number : 79919001100109LQ  
Injection Volum : 1.000µL  
Theoretical MW : 1555.61  
Observed MW : 1555.40

Interface : ESI  
Nebulizing Gas Flow : 1.50 L/min  
CDL Temp : 250°C  
CDL Volt : -25.0V  
Block Temp : 200°C

Prerod Bias : +4.5kV  
Detector : 1.5kV  
T.Flow : 0.2ml/min  
B.conc : 50%H2O/50%MeOH

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

---

Product Name	4
Order ID	81050_4
Lot No.	81050004101909BF
Sequence	NYDNSAGKW
Modification	N/A
Length	9AA
Storage	-20°C

---

---

Test Items	Specifications	Results
Molecular Weight	Theoretical MW:1054.07	Consistent
HPLC purity	>95%	97.2%
Appearance	White lyophilized powder	Conforms
Quantity	10-14 mg	14mg

---

**Caution:**

For laboratory or further manufacturing use only. Not intended for household use. If you have any questions about the Certificate of Analysis, please contact our customer service representative at 1-877-436-7274 (Toll-Free), or 1-732-885-9188.

Certified by: *Catherine* Date: 2009-10-23

Quality Assurance Department



Sample Name : 4  
 Lot No. : 81050004101909BF

Pump A : 0.065% trifluoroacetic in 100% water  
 Pump B : 0.05% trifluoroacetic in 100% acetonitrile  
 Total Flow: 1 ml/min  
 Wavelength: 220 nm

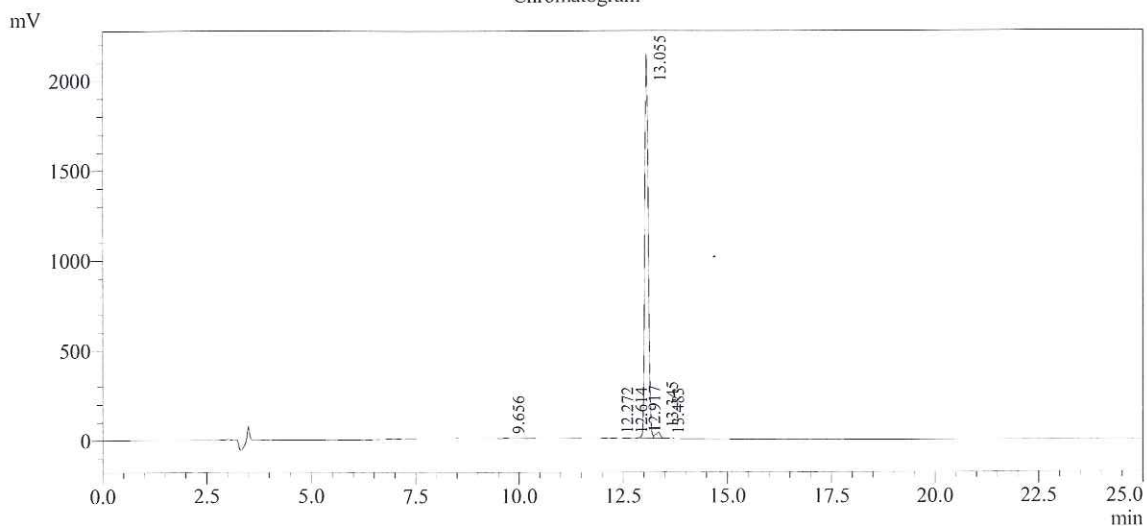
Time	Unit	Command	Value	Comment
0.01	Pumps	Pump A B.Conc	5	
25.00	Pumps	Pump A B.Conc	65	
25.01	Pumps	Pump A B.Conc	95	
35.00	Pumps	Pump A B.Conc	95	
35.01	Pumps	Pump A B.Conc	5	
45.00	Pumps	Pump A B.Conc	5	
45.01	Controller	Stop		

<<Column Performance>>

<Detector A>

Column : AlltimaTM C18 4.6 x 250 mm

Chromatogram



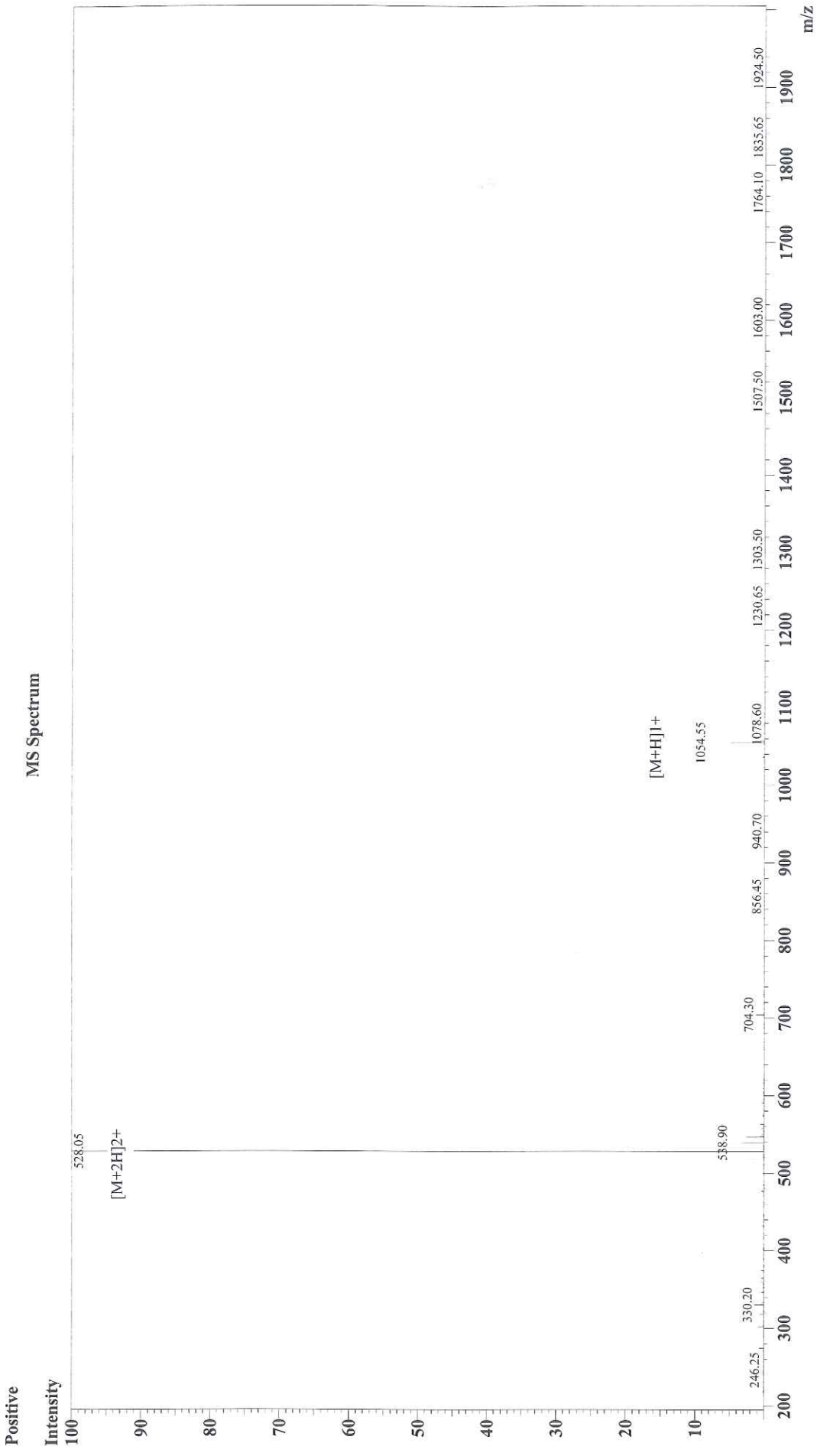
1 Det.A Ch1 / 220nm

Peak Table

Detector A Ch1 220nm

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %
1	9.656	7841	1474	0.061
2	12.272	15720	2555	0.122
3	12.614	10895	2214	0.085
4	12.917	42463	10232	0.331
5	13.055	12481029	2144324	97.184
6	13.345	277651	36405	2.162
7	13.483	7071	1615	0.055
Total		12842669	2198818	100.000

MS Spectrum



Sample Information  
User : Grace  
Date Acquired : 10/20/2009 13:36:57  
Sample Name : 4  
Lot Number : 81050004101909BF  
Injection Volum : 1.000µL  
Theoretical MW : 1054.07  
Observed MW : 1054.10

Interface : ESI  
Nebulizing Gas Flow : 1.50 L/min  
CDL Temp : 250°C  
CDL Volt : -25.0V  
Block Temp : 200°C

Prerod Bias : +4.5kv  
Detector : 1.5kv  
T.Flow : 0.2ml/min  
B.conc : 50% $H_2O$ /50% $MeOH$

# BIBLIOGRAFÍA



- Aaker D, Day G. 1989. Investigación de mercados. McGraw-Hill, México, p. 715.
- Abdullah MM, Cyr A, Lepine MC, Labonté ME, Couture P, Jones PJ, Lemarché B. 2015. Recommended dairy product intake modulates circulating fatty acid profile in healthy adults: a multi-center cross-over study. *British Journal of Nutrition* 113(3): 435-444.
- Abuissa H, O'Keefe JH, Cordain L. 2005. Realigning our 21st century diet and lifestyle with our hunter-gatherer genetic identity. *Directions Psychology* 25: SR1-SR10.
- Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Keen CL, Fraga CG. 2003. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by flavan-3-ols and procyanidins. *The Federation of European Biochemical Societies (FEBS)* 555: 597-600.
- Adam TC, Westerterp-Plantenga MS. 2005a. Glucagon-like peptide-1 release and satiety after a nutrient challenge in normal-weight and obese subjects. *British Journal of Nutrition* 93(6): 845-851.
- Adam TC, Westerterp-Plantenga MS. 2005b. Nutrient-stimulated GLP-1 release in normal-weight men and women. *Hormone and Metabolic Research* 37: 111-117.
- Adeyeye EI, Akinyeye RO, Ogunlade I, Olaofe O, Boluwade JO. 2010. Effect of farm and industrial processing on the amino acid profile of cocoa beans. *Food Chemistry* 118: 357-563.
- Adrian TE, Ferri GL, Bacarese-Hamilton AJ, Fuessl HS, Polak JM, Bloom SR. 1985. Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY. *Gastroenterology* 89: 1070-1077.
- AESAN (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria y Nutrición). Arola, L. III Curso de Seguridad Alimentaria y Nutrición. MESA REDONDA: Comunicación Industria/Consumidores: Publicidad y Etiquetado de Alimentos ([http://www.aesan.mspsi.gob.es/AESAN/docs/docs/notas\\_prensa/esco\\_Arola\\_Ferrer.pdf](http://www.aesan.mspsi.gob.es/AESAN/docs/docs/notas_prensa/esco_Arola_Ferrer.pdf)) Fecha de consulta: 22-07-2015.
- AESAN 2013. Revista del Comité Científico nº 17. Ministerio de Sanidad, Seguridad Social e Igualdad. Gobierno de España ([http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/publicaciones\\_estudios/revistas/revista\\_17.pdf](http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/publicaciones_estudios/revistas/revista_17.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Afoakwa E. 2010. Sensory character and flavor perception of chocolates. *Chocolate Science and technology* (pp73-90). Oxford: Wiley- Blackwell.

Agapitov A, Correia M, Surkey C, Brenz T, Haynes W. 2001. Sympathetic control of vascular tone in obese humans. *American Journal of Hypertension* 14 (1): A23.

Agerholm-Larsen L, Raben A, Haulrik N, Hansen AS, Manders M, Astrup A. 2000. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *European Journal of Clinical Nutrition* 54: 288–297.

Aghamohammadzadeh R, Heagerty AM. 2012 Obesity-related hypertension: epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. *Annals of Medicine* 44(1): S74–S84.

Agyente-Badu CK, Adomako D, Asante EG. 2003a. Development of cocoa butter-based toilet soap. International Workshop on Cocoa By-products in Ghana; Accra: 44–47.

Agyente-Badu CK, Gyedu E, Adomako D. 2003b. Development of cocoa butter-based pomade. International Workshop on Cocoa By-products in Ghana, Accra: 35-36

Ahn MY, Jee SD, Lee BM. 2007. Antiobesity effects of *Isaria sinclairii* by repeated oral treatment in obese Zucker rats over a 4-month period. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 70: 1395–1401.

Al-Awar R, Obeid O, Hwalla N, Azar S. 2005. Postprandial acylated ghrelin status following fat and protein manipulation of meals in healthy young women. *Clinical Science (Lond)* 109: 405–411.

Alfieri MA, Pomerleau J, Grace DM, Anderson L. 1995. Fiber intake of normal weight, moderately obese and severely obese subjects. *Obesity Research* 3: 541-547.

Ali F, Ismail A, Kersten S. 2014. Molecular mechanisms underlying the potential antiobesity-related diseases effect of cocoa polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research* 58(1): 33-48.

Alimarket. Informe Annual 2013 (<http://www.alimarket.es/noticia/170805/Chocolates--Las-marcas-de-fabricante-conquistan-espacio-en-el-lineal>). Fecha de consulta: 02-03-2015.

Allen RR, Carson L, Kwik-Urbe C, Evans EM, Erdman JW. 2008. Daily consumption of a dark chocolate containing flavanols and added sterol esters affects cardiovascular risk factors in a normotensive population with elevated cholesterol. *Journal of Nutrition* 138(4): 725-731.

Almiron-Roig E, Palla L, Guest K, Ricchiuti C, Vint N, Jebb SA, Drewnowski A. 2013. Factors that determine energy compensation: a systematic review of preload studies. *Nutrition Reviews* 71(7): 458-473.

Almoosawi S, Fyfe L, Ho C, Al-Dujaili E. 2010. The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *British Journal of Nutrition* 103(6): 842-850.

Alonso A, de la Fuente C, Beunza JJ, Sánchez-Villegas A, Martínez-González MA. 2005. Chocolate consumption and incidence of hypertension. *Hypertension* 46(6): 21-22.

Anderson GH, Moore SE. 2004. Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. *Journal of Nutrition* 134: 974S–979S.

Andreu D, Rivas L. 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415-433.

Anttolainen M, Luoto R, Uutela A, Boice JD, Blot WJ, Mclaughlin JK, Puska P. 2001. Characteristics of users and nonusers of plant stanol ester margarine in Finland: An approach to study functional foods. *Journal of the American Dietetic Association* 101: 1365-1368.

AOA. 2002. A profile of older Americans: 2002. Future growth. Administration on Aging, U.S. Department of Health and Human Services, Washington, DC. (<http://www.aoa.gov/prof/Statistics/profile/2.asp>). Fecha de consulta: 14-04-2015.

Appiah MR. 2003. Introduction to technical presentations by Cocoa Research Institute of Ghana. Paper presented at: International Workshop on Cocoa By-Products in Ghana La-Palm Royal Hotel, Accra: 22–25. Fecha de consulta: 22-07-2015.

Aranceta J, Foz M, Gil B, Jover E, Mantilla T, Millán J. 2003. Documento de consenso: obesidad y riesgo cardiovascular. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis* 15: 196-233.

Ares G, Gámbaro A. 2007. Influence of gender, age and motives underlying food choice on perceived healthiness and willingness to try functional foods. *Appetite* 49(1): 148-158.

Arumugan M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruis T, Batto JM, Bertalan M, Borrueal N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa KM, Lecierc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473: 174-180.

Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, Fraser AG, Kamath RS, Ahinger J, Ruvkun G. 2003. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421 (6290): 268-272.

Ashrafi K. 2007. Obesity and the regulation of fat metabolism. Department of Physiology, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143 USA. ([http://www.wormbook.org/chapters/www\\_obesity/obesity.pdf](http://www.wormbook.org/chapters/www_obesity/obesity.pdf)). Fecha de consulta 22-07-2015.

Astrup A, Grunwald GK, Melanson EL, Saris WH, Hill JO. 2000a. The role of low-fat diets in body weight control: a meta-analysis of ad libitum dietary intervention studies. *International Journal of Obesity and related metabolic disorders* 24 (12): 1545–1552.

Astrup A, Ryan L, Grunwald GK, Storgaard M, Saris W, Melanson E, Hill JO. 2000b. The role of dietary fat in body fatness: evidence from a preliminary metaanalysis of ad libitum low-fat dietary intervention studies: *British Journal of Nutrition* 83(1): S25–S32.

Atlantia Food Clinical Trials (<http://www.atlantiafoodclinicaltrials.com/articles-and-opinion-papers1?rdDF=Cardiovascular%20Health%20Claims.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Baba S, Natsume M, Yasuda A, Nakamura Y, Tamura T, Osakabe N, Kanegae M, Kondo K. 2007a. Plasma LDL and HDL cholesterol and oxidized LDL concentrations are altered in normo- and hypercholesterolemic humans after intake of different levels of cocoa powder. *Journal of Nutrition* 137(6): 1436-1641.

Baba S, Osakabe N, Kato Y, Natsume M, Yasuda A, Kido T, Fukuda K, Muto Y, Kondo K. 2007b. Continuous intake of polyphenolic compounds containing cocoa



powder reduces LDL oxidative susceptibility and has beneficial effects on plasma HDL-cholesterol concentrations in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 85(3): 709-717.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 101 (44): 15718-15723.

Bäckhed F, Ley R, Sonnburg JL, Peterson DA, Gordon JI. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915–1920.

Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 104: 979–984.

Balderjahn I. 1988. Personality variables and environmental attitudes as predictors of ecologically responsible consumption patterns. *Journal of Business Research* 17: 51-56.

Barczak G, Kahn KB. 2012. Identifying new product development best practice. *Business Horizons* 55(3): 293 – 305.

Barros RM, Malcata FX. 2004. A kinetic model for hydrolysis of whey protein by cardosin A extracted from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry* 88 (3): 351-359.

Beamon, BM. 1998. A process quality model for the analysis, improvement and control of supply chain systems. *Logistics Information Management* 11(2): 105-113.

Bech-Larsen T, Grunert KG, Polsen JB. 2001. The acceptance of functional foods in Denmark, Finland and the United States. A study of consumers' perceptions of general health factors and cultural values. Working paper no.7 in: *The Aarhus School of Business* (73).

Bech-Larsen T, Grunert KG. 2003. The perceived healthiness of functional foods- A conjoint study of Danish, Finnish and American consumer's perception of functional foods. *Appetite* 410: 9-14.

Bech-Larsen T, Scholderer J. 2007. Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science and Technology* 18(4): 231-234.

Bell EA, Roe LS, Rolls BJ. 2003. Sensory-specific satiety is affected more by volume than by energy content of a liquid food. *Physiology and Behavior* 78: 593–600.

Bello NT, Liang NC. 2011. The use of serotonergic drugs to treat obesity – is there any hope?. *Drug Design, Development and Therapy* 5: 95–109.

Bensaid A, Tome D, Gietzen D, Even P, Morens C, Gaussercs N, Fromentin G. 2002. Protein is more potent than carbohydrate for reducing appetite in rats. *Physiology and Behavior* 75: 311–320.

Berg RD. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4: 430–435.

Berghöfer A, Pischon T, Reinhold T, Apovian CM, Sharma AM, Willich SF. 2008. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BCM Public Health* 8: 200.

Berthoud HR. 2003. Neural systems controlling food intake and energy balance in the modern world. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 6: 615–620.

Bessesen DH. 2001. The role of carbohydrates in insulin resistance. *Journal of Nutrition* 131: 2782S–2786S.

Bilman EM, Kleef EV, Mela DJ, Hulshof T, van Trijp HCM. 2012. Consumer understanding, interpretation and perceived levels of personal responsibility in relation to satiety-related claims. *Appetite* 59(3): 912-920.

BIOCLA. 2011. [http://cordis.europa.eu/news/rcn/32983\\_en.html](http://cordis.europa.eu/news/rcn/32983_en.html). Fecha de consulta: 22-8-2015.

Birari RB, Bhutani KK. 2007. Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today* 12; 19-20: 879-889.

Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda, H. 1999. Screening of lipase inhibitors from marine algae. *Lipids* 34: 441–445.

Blankson H, Stakkestad JA, Fagertun H, Thom E, Wadstein J, Gudmundsen O. 2000. Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *Journal of Nutrition* 130: 2943-2948.

Blom WAM, Lluch A, Stafleu A, Vinoy S, Holst JJ, Schaafsma G, Hendriks HFJ. 2006. Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. *American Journal of Clinical Nutrition* 83: 211–220.

Blundell J, Rogers P, Hill A. 1987. Evaluating the satiating power of foods: implications for acceptance and consumption. In J. Colms, D. A. Booth, R. M. Pangborn, & O. Raunhardt (Eds.). *Food acceptance and nutrition* 205-219.

Blundell J. 2010. Making claims: functional foods for managing appetite and weight. *Nature Reviews Endocrinology* 6(1): 53-56.

Blundell JE, Hill AJ. 1986. Influence of tryptophan on appetite and food selection in man. En: Kaufman S, Fernstrom, J., Roth, R., Woo, S. ed. *Amino acids in health and disease: new perspectives*. New York: Alan R Liss Inc: (55): 1-14.

Blundell JE, King N, Halford JCG, Graeme S. 2002. Appetite control system and functional foods for the control of energy intake. En: Palou A, Bonet, M.L., Serra, F., ed. *Study on 'Obesity and Functional Foods in Europe'*. *European Cooperation in the Field of Scientific and Technical Research* (Organization). COST Action 918: 302-316.

Bondioliotti G, Bareggi SR, Frega NG, Strabioli S, Cornelli U. 2007. Activity of two different polyglucosamines, L112\_ and FF45\_, on body weight in male rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 567: 155–158.

Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. 2015. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Disease* 10:6 (2): 109-120.

Bonvehí JS. 2005. Investigation of aromatic compounds in roasted cocoa powder. *European Food Research and Technology* 221: 19–29.

Borchers AT, Keen CL, Hannum SM, Gershwin ME. 2000. Cocoa and chocolate: composition, bioavailability, and health implications. *Journal of Medical Food* 3: 77–105.

Borzoei S, Neovius M, Barkeling B, Teixeira-Pinto A, Rössner S. 2006. A comparison of effects of fish and beef protein on satiety in normal weight men. *European Journal of Clinical Nutrition* 60(7): 897-902.

Boudina S, Abel D. 2007. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation* 115: 3213-3223.

Bourassa P, Côté R, Hutchandani S, Samson G, Tajmir-Riahi HA. 2013. The effect of milk alpha-casein on the antioxidant activity of tea polyphenols. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 128: 43-49.

Bourdon I, Yokoyama W, Davis P, Hudson C, Backus R, Richter D, Knuckles B, Schneeman BO. 1999. Postprandial lipid, glucose, insulin, and cholecystokinin responses in men fed barley pasta enriched with beta-glucan. *American Journal of Clinical Nutrition* 69: 55–63.

Bourdon I, Olson B, Backus R, Richter BD, Davis PA, Schneeman BO. 2001. Beans, as a source of dietary fiber, increase cholecystokinin and apolipoprotein b48 response to test meals in men. *Journal of Nutrition* 131: 1485–1490.

Bowen J, Noakes M, Clifton PM. 2006a. Appetite regulatory hormone responses to various dietary proteins differ by body mass index status despite similar reductions in ad libitum energy intake. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 91: 2913–2919.

Bowen J, Noakes M, Trenergy C, Clifton PM. 2006b. Energy intake, ghrelin, and cholecystokinin after different carbohydrate and protein preloads in overweight men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 91: 1477–1483.

Brand-Miller JC, Holt SH, Pawlak DB, McMillan J. 2002. Glycemic index and obesity. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 281S–285S.

Bravo L. 1993. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews* 56 (11): 317–333.

Bray GA. 2004. Medical consequences of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89: 2583–2589.

Brighenti F, Valtueña S, Pellegrini N, Ardigò D, Del Rio D, Salvatore S, Piatti P, Serafini M, Zavaroni I. 2005. Total antioxidant capacity of the diet is inversely and independently related to plasma concentration of high-sensitivity C-reactive protein in adult Italian subjects. *British Journal of Nutrition* 9(5): 619–625.

Brodgen KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* 3: 238–250.

Brodie AE, Manning VA, Ferguson KR, Jewell DE, Hu CY. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits differentiation of pre- and post-confluent 3T3-L1 preadipocytes but inhibits cell proliferation only in pre-confluent cells. *Journal of Nutrition* 129: 602–606.

Brown KL, Hancock RE. 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology* 18: 24–30.

Brunstrom JM, Brown S, Hinton EC, Rogers PJ, Fay SH. 2011. 'Expected satiety' changes hunger and fullness in the intermeal interval. *Appetite* 56(2): 310–315.

Brubaker LP, Anini Y. 2003. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 81: 1005–1012.

Bucheli P, Rousseau G, Alvarez M, Laloï M, McCarthy J. 2001. Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49(10): 5046-5051.

Buijsse B, Feskens EJ, Kok FJ, Kromhout D. 2006. Cocoa intake, blood pressure, and cardiovascular mortality: the Zutphen Elderly Study. *Archives of Internal Medicine* 27; 166(4): 411-417.

Burns AA, Livingstone MB, Welch RW, Dunne A, Reid CA, Rowland IR. 2001. The effect of yogurt containing a novel fat emulsion on energy and macronutrient intakes in non-overweight and obese subjects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 25(10): 1487-1496.

Businaro R, Ippoliti F, Ricci S, Canitani N, Fuso A. 2012. Alzheimer's disease promotion by obesity: Induced mechanism-molecular links and perspectives. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, ID 986823, 13 pages.

Calbet JA, Holst JJ. 2004. Gastric emptying, gastric secretion and enterogastrone response after administration of milk proteins or their peptide hydrolysates in humans. *European Journal of Nutrition* 43: 27–39.

Campbell, CL. The Effects of Cocoa Polyphenols and Whey Proteins on Biomarkers of Satiety and Lipid Metabolism. 2014. Tesis de Master, bajo la dirección de Dr. Keith Harris, Dr. Allen Foegeding, and Dr. Clay Clark. (<http://repository.lib.ncsu.edu/ir/bitstream/1840.16/9537/1/etd.pdf>). Fecha de consulta 22-07-2015.

Canale MP, Manca di Villahermosa S, Martino G, Rovella V, Noce A, De Lorenzo A, Di Daniele N. 2013. Obesity-related metabolic syndrome: mechanisms of sympathetic overactivity. *International Journal of Endocrinology*, ID865965, 12 pages. (<http://www.hindawi.com/journals/ije/2013/865965/>) . Fecha de consulta: 22-07-2015

Cao ZP, Wang F, Xiang XS, Cao R, Zhang WB, Gao SB. 2007. Intracerebroventricular administration of conjugated linoleic acid (CLA) inhibits food intake by decreasing gene expression of NPY and AgRP. *Neurosciences Letters* 418: 217–221.

Cardello A. 1996. The role of human senses in food acceptance. En: Meiselman H. y MacFie H. (Eds.), *Food Choice, Acceptance, and Consumption*, pp. 1-82, Blackie, London.

Cassady BA, Considine RV, Mattes RD. 2012. Beverage consumption, appetite, and energy intake: what did you expect? *American Journal of Clinical Nutrition* 95(3): 587-593.

Cawley J. 2010. The medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. *Journal of Health Economics* 31(1): 219-230.

Chambers E, Smith EA. 1991. The uses of qualitative research in product research and development. En: Lawless H. T. y Klein B. P. (Eds.), *Sensory science theory and applications in foods*, pp. 395–412, Blackie Academic y Professional, Londres.

Chaput JP, St-Pierre S, Tremblay A. 2007. Currently available drugs for the treatment of obesity: sibutramine and Orlistat. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 7: 3–10.

Chiang SH, Mac Dougald OA. 2003. Will fatty worms help cure human obesity? *Trends Genetics* 19(10): 523-525.

Childs NM. 1997. Functional foods and the food industry: consumer, economic and product development issues. *Journal of Nutraceuticals Functional and Medical Foods* 1(2): 25-43.

Choi Y, Kim YC, Han YB, Park Y, Pariza MW, Ntambi JM. 2000. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Nutrition* 130: 1920–1924.

Cholo B. 2005. Living with your ex: a Brand new world, pg4 “Top 25 Biggest product flops all time”. Fecha de consulta 11-01-2015.

Choudhary M, Grover K. 2012. Development of functional food products in relation to obesity. *Functional Foods in Health and Disease* 2(6): 188-197.

Cienfuegos-Jovellanos E, Ibarra A, Pasamar MA, Montañés J, Pons JV. 2006. Proceso para la obtención de polvo de cacao rico en polifenoles y de bajo contenido en materia grasa y polvo de cacao obtenido. ES200600462. Fecha de consulta: 21-07-2015.

Cienfuegos-Jovellanos E, Quiñones M, Muguerza M, Moulay L, Miguel M, Alexandre A. 2009. Antihypertensive Effect of a Polyphenol-Rich Cocoa Powder Industrially Processed To Preserve the Original Flavonoids of the Cocoa Beans. *Journal Agriculture Food Chemistry* 57 (14): 6156–6162.

Clement L, Poirier H, Niot I, Bocher V, Guerre-Millo M, Krief S, Staels B, Besnard P. 2002. Dietary trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *Journal of Lipid Research* 43: 1400–1409.

Codex Alimentarius. Normas internacionales de los alimentos. Adoptado en 1995. Revisión 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014 ([http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS\\_192s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Codex Alimentarius 2014. Normas Internacionales de los Alimentos. Norma para el cacao en pasta (Licor de cacao/chocolate) y torta de cacao. Codex Stan 141-1983. Fecha de consulta 22-07-2015.

Coppens P, Fernandes da Silva M, Pettman S. 2006. European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicology* 221: 59-74.

Cooper GJS, Willis AC, Clark A, Turner RC, Sim RB, Reid KBM. 1987. Purification and characterization of a peptide from amyloid-rich pancreases of type 2 diabetic patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 84: 8628–8632.

Cooper RG, Edgett SJ, Kleinschmidt EJ. 2002. Improving new product development performance and practices. Houston, TX: American Productivity and Quality Center.

Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, Williamson G. 2007. Cocoa and health: a decade of research. *British Journal of Nutrition* 99(1): 1-11.

Copinschi G, Wegienka LC, Hane S, Forsham PH. 1967. Effect of arginine on serum levels of insulin and growth hormone in obese subjects. *Metabolism* 16: 485–491.

Cox HM. 2007. Peptide YY: a neuroendocrine neighbor of note. *Peptides* 28: 345–351.

Crovetti R, Santangelo A, Riso MS, Porrini M. 1997. Sweet taste reactivity and satiety. *Nutrition Research* 17: 1417–1425.

Crum AJ, Corbin WR, Brownell KD, Salovey P. 2011. Mind over milkshakes: mindsets, not just nutrients, determine ghrelin response. *Health Psychology* 30(4): 424-429.

Cuenca-García M, Ruiz JR, Ortega FB, Castillo MJ. 2014. Association between chocolate consumption and fatness in European adolescents. *Nutrition* 30(2): 236-239.

Cummings DE, Overduin J. 2007. Gastrointestinal regulation of food intake. *Journal of Clinical Investigation* 117: 13–23.

Dangin M, Boirie Y, Garcia-Rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier R, Ballevre O, Beaufrère B. 2001. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *American Journal of Physiology* 280: 340–348.

Davidson TL, Swithers SE. 2005. Food viscosity influences caloric intake compensation and body weight in rats. *Obesity Research* 13(3): 537-544.

de Graaf C, Blom WA, Smeets PA, Stafleu A, Hendriks HF. 2004. Biomarkers of satiation and satiety. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 946–961.

de Simone G, D'Addeo G. 2008. Sibutramine: balancing weight loss benefit and possible cardiovascular risk. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 18: 337–341.

Deliza R, MacFie H. 1996. External cues and its effect on sensory perception and hedonic ratings: A review. *Journal of Sensory Studies* 11: 103-128.

Delzenne N, Ferre P, Beylot M, Daubioul C, Declercq B, Diraison F, Dugail I, Foufelle F, Foretz M, Mace K, Reimer R, Palmer G, Rutter G, Tavare J, Van Loo J, Vidal H. 2001. Study of the regulation by nutrients of the expression of genes involved in lipogenesis and obesity in humans and animals. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 11: 118-121.

Delzenne N, Reid G. 2009. No causal link between obesity and probiotics. *Nature Reviews Microbiology* 7 (12): 901.

Desideri G, Kwik-Urbe C, Grassi D, Necozione S, Ghiadoni L, Mastroiacovo D, Raffaele A, Ferri L, Bocale R, Lechiara MC, Marini C, Ferri C. 2012. Benefits in cognitive function, blood pressure, and insulin resistance through cocoa flavanol consumption in elderly subjects with mild cognitive impairment: the Cocoa, Cognition, and Aging (CoCoA) Study. *Hypertension* 60: 794-801.

Di Chiara T, Argano C, Corrao S, Scaglione R, Licata G. 2012. Hypoadiponectinemia: a link between visceral obesity and metabolic syndrome. *Journal of Nutrition and Metabolism* ID 175245: 1-7.



Di Meglio DP, Mattes RD. 2000. Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *International Journal of Obesity Related Metabolic Disorders* 24(6): 794-800.

Di Renzo L, Rizzo M, Sarlo F, Colica C, Lacopino L, Domino E, Sergi D, De Lorenzo A. 2013. Effects of dark chocolate in a population of normal weight obese women: a pilot study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 17(16): 2257-2266.

Dillman DA, Smyth JD, Christian LM. 2014. Internet, Mail and Mixed-Mode Surveys. The tailored Design Method, 4th edition. Wiley, Hoboken, New Jersey. Fecha de consulta 24-10-2014.

Ding EL, Hutflless SM, Ding X, Girotra S. 2006. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutrition and Metabolism* 3; 3:2.

Diplock AT, Aggett PJ, Ashwell M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid MB. 1999. Scientific concepts of Functional Foods in Europe: consensus document. *British Journal of Nutrition* 81: S1-S27.

Dixon J. 2010. The effect of obesity on health outcomes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 316(2): 104-108.

Donkor ON, Henriksson A, Singh TK, Vasiljevic T, Shah NP. 2007. ACE inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal* 17: 1321-1331.

Druce MR, Wren AM, Park AJ, Milton JE, Patterson M, Frost G, Ghatei MA, Small C, Bloom SR. 2005. Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *International Journal of Obesity* 29: 1130–1136.

Druce MR, Neary NM, Small CJ, Milton J, Monteiro M, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR. 2006. Subcutaneous administration of ghrelin stimulates energy intake in healthy lean human volunteers. *International Journal of Obesity* 30: 293–296.

Drucker DJ. 2006. The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism* 3: 153–165.

Eaton S. 2002. Control of mitochondrial  $\beta$ -oxidation flux. *Progress in Lipid Research* 41: 197-239.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308: 1635–1638.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet P. 2005. The metabolic syndrome. *The Lancet* 365: 1415-1428.

EFSA Journal 2010. Scientific Opinion on the modification of the authorisation of a health claim related to water-soluble tomato concentrate and helps to maintain a healthy blood flow and benefits circulation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006 following a request in accordance with Article 19 of the Regulation (EC) No 1924/2006 (<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1689.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

EFSA Journal 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to walnuts and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1156, 1158) and improvement of endothelium-dependent vasodilation (ID 1155, 1157) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 (<http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/2074.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015

EFSA Journal 2012. Guidance on the scientific requirements for health claims related to appetite ratings, weight management, and blood glucose concentrations (<http://www.efsa.europa.eu/fr/search/doc/2604.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015

EFSA Journal 2012-2014. Scientific Opinion on the modification of the authorisation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006 following a request in accordance with Article 19 of Regulation (EC) No 1924/2006 (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3654.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015

EFSA Journal 2015. Scientific opinion on the essential composition of total diet replacements for weight control. (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3957.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015

El Sohaimy SA. 2012. Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal* 20(5): 691-708.

Elliott RM, Morgan LM, Tredger JA, Deacon S, Wright J, Marks V. 1993. Glucagon-like peptide-1 (7-36) amide and glucose-dependent insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *Journal of Endocrinology* 138: 159-166.

Encuesta Nacional de Salud 2011-2012 (<http://www.ine.es/prensa/np770.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015

Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, Mietus-Snyder ML. 2004. Flavonoid-rich dark chocolate

improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *Journal of the American College of Nutrition* 23(3): 197-204.

Engler MB, Engler MM. 2006. The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. *Nutrition Reviews* 64(3): 109-118.

Enrique M, Marcos JF, Yuste M, Martinez M, Vallés S, Manzanares P. 2008. Inhibition of the wine spoilage yeast *Dekkera bruxellensis* by bovine lactoferrin-derived peptides. *International Journal of Food Microbiology* 127: 229-234.

Enrique M, Manzanares P, Yuste M, Martinez M, Vallés S, Marcos JF. 2009. Selectivity and antimicrobial action of bovine lactoferrin derived peptides against wine lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 26: 340-346.

Erdmann J, Lippl F, Schusdziarra, V. 2003. Differential effect of protein and fat on plasma ghrelin levels in man. *Regulatory Peptides* 116: 101-107.

Erdmann J, Topsch R, Lippl, F., Gussmann, P., Schusdziarra, V. 2004. Postprandial response of plasma ghrelin levels to various test meals in relation to food intake, plasma insulin, and glucose. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89: 3048-3054.

Erdmann J, Leibl M, Wagenpfeil S, Lippl F, Schusdziarra V. 2006. Ghrelin response to protein and carbohydrate meals in relation to food intake and glycerol levels in obese subjects. *Regulatory peptides* 135: 23-29.

Erkkilä AT, Lichtenstein AH. 2006. Fiber and cardiovascular disease risk: how strong is the evidence? *Journal of Cardiovascular Nursing* 21: 3-8.

Esler M. 2000. The sympathetic system and hipertensión. *American Journal of Hypertension* 13: S99-105.

Esler M. 2001. Sympatheic nervus system and insulin resistance: from obesity to diabetes. *American Journal of Hypertension* 14: A264.

European Commission. 2013. Directorate General for Health and Consumers Scoping study Delivering on EU food safety and nutrition in 2050 Scenarios of future change and policy responses ([http://ec.europa.eu/food/safety/docs/final\\_report\\_scoping\\_study\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/safety/docs/final_report_scoping_study_en.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

European Food Information Council (EUFIC) (<http://www.eufic.org/jarticle/es/expid/basics-obesidad-exceso-peso>). Fecha de consulta: 14-05-2015.

Evans M, Geigerman C, Cook J, Curtis L, Kuebler B, McIntosh M. 2000. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids* 35: 899–910.

Farhat G, Drummond S, Fyfe L, Al-Dujaili EA. 2014. Dark chocolate: an obesity paradox or a culprit for weight gain? *Phytotherapy Research* 28(6): 791-797.

Faridi Z, Njike VY, Dutta S, Ali A, Katz DL. 2008. Acute dark chocolate and cocoa ingestion and endothelial function: a randomized controlled crossover trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 88(1): 58-63.

Feltrin KL, Little TJ, Meyer JH, Horowitz M, Smout AJPM, Wishart J, Pilichiewicz AN, Rades T, Chapman IM, Feinle-Bisset C. 2004. Effects of intraduodenal fatty acids on appetite, antropyloroduodenal motility, and plasma CCK and GLP-1 in humans vary with their chain length. *American Journal Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 287: 524–533.

Feltrin KL, Little TJ, Meyer JH, Horowitz M, Rades T, Wishart J, Feinle-Bisset, C. 2007. Effects of lauric acid on upper gut motility, plasma cholecystokinin and peptide YY, and energy intake are load, but not concentration, dependent in humans. *Journal of Physiology* 581: 767–777.

Finkelstein EA, Dibonaventura M, Burgess SM, Hale BC. 2010. The costs of obesity in the workplace. *Journal of Occupational and Environmental Medicine (JOEM)* 52 (10): 971-976.

Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. 2003. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of Hypertension* 21(12): 2281-2286.

Fisher ND, Hollenberg NK. 2006. Aging and vascular responses to flavanol-rich cocoa. *Journal of Hypertension* 24(8): 1575-1580.

Flammer AJ, Hermann F, Sudano I, Spieker L, Hermann M, Cooper KA, Serafini M, Lüscher TF, Ruschitzka F, Noll G, Corti R. 2007. Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* 20; 116(21): 2376-2382.

Flint A, Raben A, Blundell JE, Astrup A. 2000. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *International Journal of Obesity* 24: 38–48.

Food Business News. 2014 ([http://www.foodbusinessnews.net/articles/news\\_home/businesNews/2014/12/United\\_States\\_poised\\_to\\_lead\\_f.aspx?ID=%7B3E104CB5-F892-46A3B9894A798CBB1B66%7D&cck=1](http://www.foodbusinessnews.net/articles/news_home/businesNews/2014/12/United_States_poised_to_lead_f.aspx?ID=%7B3E104CB5-F892-46A3B9894A798CBB1B66%7D&cck=1)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Forde CG, van Kuijk N, Thaler T, de Graaf C, Martin N. 2013. Oral processing characteristics of solid savoury meal components and relationship with food composition, sensory attributes and expected satiation. *Appetite* 60(1): 208-219.

Fraga CG, Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Carrasquedo F, Lotito SB, Lazarus S, Schmitz HH, Keen CL. 2005a. Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clinical and Developmental Immunology* 12(1): 11-17.

Fraga CG. 2005b. Cocoa, diabetes, and hypertension: should we eat more chocolate? *American Journal of Clinical Nutrition* 81(3): 541-542.

Fraga CG, Litterio MC, Prince PD, Calabró V, Piotrkowski B, Galleano M. 2011. Cocoa flavanols: effects on vascular nitric oxide and blood pressure. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 48(1): 63-67.

Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW. 1998. Variations in bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 3336–3345.

Frost GS, Brynes AE, Dhillon WS, Bloom SR, McBurney MI. 2003. The effects of fibre enrichment of pasta and fat content on gastric emptying, GLP-1, glucose, and insulin responses to a meal. *European Journal of Clinical Nutrition* 57: 293–298.

Fujita H, Yokoyama K, Yasumoto R, Yoshikawa M. 1995. Antihypertensive effect of thermolysin digest of dried bonito in spontaneously hypertensive rat. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 22: S304-S305.

Fujita H, Yoshikawa M. 1999. LKPNM: a prodrug-type ACE inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology* 44: 123-127.

Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. 2002. Oral arginine does not stimulate an increase in insulin concentration but delays glucose disposal. *American Journal of Clinical Nutrition* 76: 1016–1022.

Garrison RJ, Kannel WB, Stokes JS. 1987. Incidence and precursors of hypertension in young adults; the Framingham Offspring Study. *Preventive Medicine* 16: 235-251.

Gibbons M, Limoges C, Nowotny H, Schwartzman S, Scott P, Trow M. 1994. The new production of knowledge: The dynamics of science and research in contemporary societies, London, Sage.

Gilbert L. 1997. Consumer market for functional foods. *Journal of Nutraceuticals Functional and Medical Foods* 1: 5-21.

Gilbert L. 2000. The functional food trend: What 's next and what Americans think about eggs. *Journal of the American College of Nutrition* 19: 507S-512S.

Gøbel RJ, Larsen N, Jakobsen M, Mølgaard C, Michaelsen KF. 2012. Probiotics to adolescents with obesity: effects on inflammation and metabolic syndrome. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 55: 673–678.

Gonçalves R, Mateus N, de Freitas V. 2010. Study of the interaction of pancreatic lipase with procyanidins by optical and enzymatic methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24; 58(22): 11901-11906.

Gonzalez-Tello P, Camacho F, Jurado E, Paez MP, Guadix EM. 1994a. Enzymatic hydrolysis of whey protein I. Kinetic models. *Biotechnology and Bioengineering* 44(4): 523-528.

Gonzalez-Tello P, Camacho F, Jurado E, Paez MP, Guadix EM. 1994b. Enzymatic hydrolysis of whey protein II. Molecular weigh range. *Biotechnology and Bioengineering* 44(4): 529-532.

Granado-Lorencio F, Olmedilla-Alonso B, Herrero-Barbudo C, Pérez-Sacristan B, Blanco-Navarro I, Blazquez-García S. 2007. Comparative *in vitro* bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *Journal Agricultural Food Chemistry* 55(15): 6387-6394.

Granlund L, Juvet LK, Pedersen JI, Nebb HI. 2003. Trans10, cis12-conjugated linoleic acid prevents triacylglycerol accumulation in adipocytes by acting as a PPARgamma modulator. *Journal of Lipid Research* 44: 1441–1452.

Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM, Bolla GB, Lanfranchi A, Colombo M, Giannattasio C, Brunani A, Cavagnini F, Mancia G. 1995. Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension* 25: 560-563.

Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. 2005a. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *American Journal of Clinical Nutrition* 81(3): 611-614.

Grassi D, Necozone S, Lippi C, Croce G, Valeri L, Pasqualetti P, Desideri G, Blumberg JB, Ferri C. 2005b. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension* 46(2): 398-405.

Grassi D, Desideri G, Necozone S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB, Ferri C. 2008. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *Journal of Nutrition* 138(9): 1671-1676.

Green SM, Blundell JE. 1996. Subjective and objective indices of the satiating effects of foods. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: 798–806.

Greenman Y, Golani N, Gilad S, Yaron M, Limor R, Stern N. 2004. Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clinical Endocrinology (Oxf.)* 60: 382–388.

Groschl M, Knerr I, Topf HG, Schmid P, Rascher W, Rauh M. 2003. Endocrine responses to the oral ingestion of a physiological dose of essential amino acids in humans. *Journal of Endocrinology* 179: 237–244.

Gruendel S, Garcia AL, Otto B, Mueller C, Steiniger J, Weickert MO, Speth M, Katz N, Koebnick C. 2006. Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. *Journal of Nutrition* 136: 1533–1538.

Grunert KG. 1995. Food quality: a means-end perspective. *Food Quality and Preference* 6: 171-176.

Grunert KG, Larsen TB, Bredahi L. 2000. Three issues in consumer quality perception and acceptance of dairy products. *International Dairy Journal* 10(8): 575-584.

Gu Y, Hurst WJ, Stuart DA, Lambert JD. 2011. Inhibition of Key Digestive Enzymes by Cocoa Extracts 1 and Procyanidins. *Journal Agricultural Food Chemistry* 59 (10): 5305–5311.

Gu Y, Lambert JD. 2013. Modulation of metabolic syndrome-related inflammation by cocoa. *Molecular Nutrition and Food Research* 57(6): 948-961.

Gu Y, Yu S, Park JY, Harvatine K, Lambert JD. 2014. Dietary cocoa reduces metabolic endotoxemia and adipose tissue inflammation in high-fat fed mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 25(4): 439-445.

Guerard F, Guimas L, Binet A. 2001. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic* (19-20): 489-498.

Guinard JX, Brun P. 1998. Sensory-specific satiety: comparison of taste and texture effects. *Appetite* 31: 141–157.

Guo ZF, Zheng X, Qin YW, Hu JQ, Chen SP, Zhang Z. 2007. Circulating Preprandial Ghrelin to Obestatin Ratio Is Increased in Human Obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92: 1875–1880.

Gustafson DR, McMahon DJ, Morrey J, Nan R. 2001. Appetite is not influenced by a unique milk peptide: caseinomacropptide (CMP). *Appetite* 36(2): 157-163.

Gutiérrez-Fisac JL, Guallar-Castillón P, León-Muñoz LM, Graciani A, Banegas JR, Rodríguez-Artalejo F. 2012. Prevalence of general and abdominal obesity in the adult population of Spain, 2008–2010: the ENRICA study'. *Obesity Reviews* 13: 388–392: (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-789X.2011.00964.x/abstract>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Haffner SM. 2005. Relationship of metabolic risk factors and development of cardiovascular disease and diabetes. *Obesity Silver Spring* 3: 1219-1279.

Hailu G, Boecker A, Henson S, Cranfield J. 2009. Consumer valuation of functional foods and nutraceuticals in Canada. A conjoint study using probiotics. *Appetite* 52: 257-265.

Halford JCG, Harrold JA. 2012. Satiety-enhancing products for appetite control: science and regulation of functional foods for weight management. Satellite Symposium: Industry and academic partnerships for developing health-improving products. *Proceedings of the Nutrition Society* 71: 350–362.

Hall WL, Millward DJ, Rogers PJ, Morgan LM. 2003a. Physiological mechanisms mediating aspartame-induced satiety. *Physiology and Behaviour* 78: 557-562.

Hall WL, Millward DJ, Long SJ, Morgan LM. 2003b. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition* 89: 239–248.



Hammond RA, Levine R. 2010. The economic impact of obesity in the United States. *Journal of Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity* 3: 285-295.

Han LK, Takaku T, Li J, Kimura Y, Okuda H. 1999. Anti-obesity action of oolong tea. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 23: 98-105.

Han LK, Xu BJ, Kimura Y, Zheng Y, Okuda H. 2000. Platycodi radix affects lipid metabolism in mice with high fat diet-induced obesity. *Journal of Nutrition* 130: 2760-2764.

Han LK, Kimura Y, Okuda H. 2005a. Anti-obesity effects of natural products. *Studies in Natural Products Chemistry* 30: 79-110.

Han LK, Zheng YN, Yoshikawa M, Okuda H, Kimura Y. 2005b. Anti-obesity effects of chikusetsusaponins isolated from *Panax japonicus* rhizomes. *BMC Complement Alternative Medicine* 5, 9.

Han LK, Nose RLW, Gong XJ, Zheng YN, Yoshikawa M, Koike K, Nikaido T, Okuda H, Kimura Y. 2006. Reduction of fat storage in mice fed a high-fat diet long term by treatment with saponins prepared from *Kochia scoparia* fruit. *Phytotherapie Research*. 20: 877-882.

Hancock REW. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* 1: 156-164.

Hardy G. 2000. Nutraceuticals and functional foods: Introduction and meaning. *Nutrition* 16: 688-697.

Harmsen HJM, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW. 2002. Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2982-2990.

Harp J, Henry S, Di Girolamo M. 2002. Dietary weight loss decreases serum angiotensin-converting enzyme activity in obese adult. *Obesity Research* 10: 985-990.

Hart S. 2003. New product development (12): 314 - 341, en Baker, M.J. (ed.). *The marketing book*, Butterworth Heinemann. London.

Hasegawa H, Shirohara H, Okabayashi Y, Nakamura T, Fujii M, Koide M, Otsuki M. 1996. Oral glucose ingestion stimulates cholecystokinin release in normal subjects and patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 45: 196-202.

Hashim P, Selamat J, Syed Muhammad SK, Ali A. 1998. Changes in free amino acid, peptide-N, sugar and pyrazine concentration during cocoa fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78: 535–542.

Haslam E. 1998. Practical polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. New York: Cambridge University Press.

Heini AF, Lara-Castro C, Schneider H, Kirk KA, Considine RV, Weinsier RL. 1998. Effect of hydrolyzed guar fiber on fasting and postprandial satiety and satiety hormones: a double-blind, placebo-controlled trial during controlled weight loss. *International Journal of Obesity and Related Metabolic* 22: 906–909.

Heiss C, Dejam A, Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. 2003. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* 27; 290(8): 1030-1031.

Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perré S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. 2005. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *Journal of the American College of Cardiology* 4; 46(7): 1276-1283.

Heiss C, Finis D, Kleinbongard P, Hoffmann A, Rassaf T, Kelm M, Sies H. 2007. Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 49(2): 74-80.

Heldman DR. 2004. Identifying food science and technology research needs. *Food Technology* 58: 32-34.

Henquin J, Dufrane D, Nenquin M. 2006. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes* 55: 3470–3477.

Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, Sudano I, Hermann M, Binggeli C, Lüscher TF, Riesen W, Noll G, Corti R. 2006. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart* 92(1): 119-120.

Herrmann C, Goke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Goke B. 1995. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion* 56: 117–126.

Hetherington MM, Cunningham K, Dye L, Gibson EL, Gregersen NT, Halford JCG. 2013. Potential benefits of satiety to the consumer: scientific considerations. *Nutrition Research Reviews* 26(01): 22-38.

Hildreth KL, Van Pelt RE, Schwartz RS. 2012. Obesity, insulin resistance and Alzheimer's disease. *Obesity* 20(8): 1549-1557.

Hill AJ, Blundell JE. 1988. Role of amino acids in appetite control in man. En: G H, ed. Amino acid availability and brain function in health and disease. Berlin: Springer-Verlag: 239-248.

Hilliam M. 1996. Functional foods: the western consumer viewpoint. *Nutrition Reviews* 54(11): 189-194.

Hilliam M. 1999. Functional foods. *The World of food ingredients* (¾), 46-49.

Himaya A, Fantino M, Antoine JM, Brondel L, Louis-Sylvestre J. 1997. Satiety power of dietary fat: a new appraisal. *American Journal of Clinical Nutrition* 65: 1410–1418.

Himaya SWA, Ngo DH, Ryu B, Kim SK. 2012. An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. *Food Chemistry* 132 (4): 1872-1882.

Hiuge-Shimizu A, Kishida K, Funahashi T, Ishizaka Y, Oka R, Okada M, Suzuki S, Takaya N, Nakagawa T, Fukui T, Fukuda H, Watanabe N, Yoshizumi T, Ohira T, Nakamura T, Matsuzawa Y, Yamakado M, Shimomura I. 2012. Reduction of visceral fat correlates with the decrease in the number of obesity-related cardiovascular risk factors in Japanese with Abdominal Obesity (VACATION-J Study). *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 19.

Hogenkamp PS, Stafleu A, Mars M, Brunstrom JM., de Graaf C. 2011. Texture, not flavor, determines expected satiation of dairy products. *Appetite* 57(3): 635-641.

Hogenkamp PS, Mars M, Stafleu A, de Graaf C. 2012. Repeated consumption of a large volume of liquid and semi-solid foods increases ad libitum intake, but does not change expected satiety. *Appetite* 59(2): 419-424.

Hogenkamp PS, Cedernaes J, Chapman CD, Vogel H, Hjorth OC, Zarei S. 2013. Calorie anticipation alters food intake after low-caloric not high-caloric preloads. *Obesity* 21(8): 1548-1553.

Holt SH, Brand-Miller J. 1994. Particle size, satiety and glycaemic response. *European Journal of Clinical Nutrition* 48: 496–502.

Holt SH, Miller JC, Petocz P, Farmakalidis E. 1995. A satiety index of common foods. *European Journal of Clinical Nutrition* 49(9): 675-690.

Holt SH, Delargy HJ, Lawton CL, Blundell JE. 1999. The effects of highcarbohydrate vs high-fat breakfasts on feelings of fullness and alertness, and subsequent food intake. *International Journal of Food Science and Nutrition* 50: 13-28.

Holt SH, Brand-Miller JC, Stitt PA. 2001. The effects of equal-energy portions of different breads on blood glucose levels, feelings of fullness and subsequent food intake. *Journal of the American Dietetic Association* 101: 767-773.

Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition* 22: 283-307.

Huang Z, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Stampfer MJ, Speizer FE, Colditz GA. 1998. Body weight, weight change and risk for hypertension in women. *Annual International Medicine* 128: 81-88.

Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. 1983. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham heart study. *Circulation* 67: 968-977.

Hubert P, King NA, Blundell JE. 1998. Uncoupling the effects of energy expenditure and energy intake: appetite response to short-term energy deficit induced by meal omission and physical activity. *Appetite* 31: 9-19.

ICCO 2010. Biblioteca del Parlamento Europeo. La producción del cacao en cifras ([http://www.europarl.europa.eu/pdf/cocoa/cocoa\\_exp\\_in\\_es.pdf](http://www.europarl.europa.eu/pdf/cocoa/cocoa_exp_in_es.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

IFIC 2013. 2012 Food & Health Survey: Consumer Attitudes toward Food Safety, Nutrition and Health -See more at: ([http://www.foodinsight.org/2012\\_Food\\_Health\\_Survey\\_Consumer\\_Attitudes\\_toward\\_Food\\_Safety\\_Nutrition\\_and\\_Health\\_#sthash.FO0GRqRA.dpuf](http://www.foodinsight.org/2012_Food_Health_Survey_Consumer_Attitudes_toward_Food_Safety_Nutrition_and_Health_#sthash.FO0GRqRA.dpuf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

IFT Expert Report. Functional Foods: Opportunities and Challenges ([http://www.ift.org/Knowledge-Center/Read-IFT-Publications/Science-Reports/Expert-reports/~media/Knowledge%20Center/Science%20Reports/Expert%20Reports/Functional%20Foods/Functionalfoods\\_expertreport\\_full.pdf](http://www.ift.org/Knowledge-Center/Read-IFT-Publications/Science-Reports/Expert-reports/~media/Knowledge%20Center/Science%20Reports/Expert%20Reports/Functional%20Foods/Functionalfoods_expertreport_full.pdf)). Fecha de consulta: 22-05-2015.

ILSI. 2002. Functional Foods-Scientific and Global Perspectives. pp. 7-10. ILSI Europe Series, Summary of a Symposium held in October 2001. International Life Sciences Institute Press, Washington, DC. Fecha de consulta: 22-07-2015.

INE. Instituto Nacional de Estadística 2012 ([http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2011/DeterminantesSalud\\_DistribucionPorcentual.pdf](http://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/encuestaNacional/encuestaNac2011/DeterminantesSalud_DistribucionPorcentual.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Innes AJ, Kennedy G, McLaren M, Bancroft AJ, Belch JJ. 2003. Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets* 14(5): 325-327.

Innobarometer 2014. The role of public support in the commercialisation of innovations. European Commission ([http://ec.europa.eu/public\\_opinion/flash/fl\\_394\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/public_opinion/flash/fl_394_en.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Iwaniak A, Minkiewicz P. 2007. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 6(3): 5-15.

Jalil AM, Ismail A, Pei CP, Hamid M, Kamaruddin SH. 2008. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 10; 56(17): 7877-7884.

Jang A, Lee M. 2005. Purification and identification of angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from beef hydrolysates. *Meat Science* 69: 653-661.

Janssen I, Katzmarzyk PT, Ross R. 2004. Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *American Journal Clinical Nutrition* 79: 379-84.

Je JY, Park PJ, Kwon JY, Kim SK. 2004. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 52(26): 7842-7845.

Jenkins DJ, Axelsen M, Kendall CW, Augustin LS, Vuksan V, Smith U. 2000. Dietary fibre, lente carbohydrates and the insulin-resistant diseases. *British Journal of Nutrition* 83 (1): 157-163.

Jia K, Chen D, Riddle DL. 2004. The TOR pathway interacts with the insulin signaling pathway to regulate *C. elegans* larval development, metabolism and life span. *Development* 131: 3897-3906.

Johnstone AM, Stubbs RJ, Harbron CG. 1996. Effect of overfeeding macronutrients on day-to-day intake in man. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: 418-430.

Jonas MS, Beckmann SC. 1998. Funtional foods: consumer perceptions in Denmark and England. MAPP working paper no55. Fecha de consulta: 01-02-2015.

Jones PJ, Jew S. 2007. Functional foods development: Concept to reality. *Trends in Food Science and Technology* 18: 387-390.

Juvonen K, Purhonen AK, Salmenkallio-Marttila M, Leahteenmeaki L, Laaksonen DE, Herzig KH. 2009. Viscosity of oat bran-enriched beverages influences gastrointestinal hormonal responses in healthy humans. *Journal of Nutrition* 139(3): 461-466.

Juvonen K, Liukkonen KH, Salmenkallio-Marttila M, Lyly M, Lähteenmäki L, Laaksonen D, Uusitupa M, Poutanen K, Karhunen L. 2006. Postprandial responses of bulking and viscosity-producing cereal fibers. Abstract. *Neuroendocrinological regulation of food intake*, 11–12.5. Kuopio, Finland.

Kadooka Y, Sato M, Ogawa A, Miyoshi M, Uenishi H, Ogawa H. 2013. Effect of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 in fermented milk on abdominal adiposity in adults in a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition* 110: 1696–1703.

Kammoun R, Bejar S, Ellouz R. 2003. Protein size distribution and inhibitory effect of wheat hydrolysates on neutrase<sup>®</sup>. *Bioresource Technology* 90 (3): 249-254.

Kanaya N, Chen S. 2010. Conjugated linoleic acid reduces body weight gain in ovariectomized female C57BL/6J mice. *Nutrition Research* 30: 714-721.

Karamadoukis L, Shivashankar GH, Ludeman L, Williams AJ. 2009. An unusual complication of treatment with Orlistat. *Clinical Nephrology* 71: 430–432.

Karhunen L, Flander S, Liukkonen KH, Lähteenmäki L, Valtanen S, Jalkanen H, Uusitupa M, Poutanen K. 2005. Fibre effectively inhibits postprandial decrease in plasma ghrelin concentration. Abstract. *Obesity Review* 6: 59.

Katsuragi I, Ookuma K, Yoshimatsu H, Kurokawa M, Sakata T. 1994. Mastication facilitates satiety sensation through hypothalamic neuronal histamine. *Pathophysiology* 1: 502.

Kattenberg HR. 1993. The flavor of cocoa in relation to the origin and processing of the cocoa beans. *Food Flavors Ingredients and Composition* (pp1-22). Amsterdam: Elsevier Science. Fecha de consulta: 12-10-2014.

Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. 2005. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition* 81(1): 298S-303S.

Khampuis HJ. 2010. Production and quality standards of cocoa mass, cocoa butter and cocoa powder. In S.T.Beckett (Ed). *Industrial chocolate manufacture and use*. (pp.121-141). Oxford: Wile-Blackwell. Fecha de consulta: 12-10-2014.

Kim HY, Kang MH, 2005. Screening of Korean medicinal plants for lipase inhibitory activity. *Phytotherapie Research* 19: 359–361.

Kim SR, Byun HG. 2012. The Novel Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptide from Rainbow Trout Muscle Hydrolysate. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 15(3): 183-190.

Kirchhoff PM, Biehl B, Ziegeler-Berghausen H, Hammor M, Lieberei R. 1989. Kinetics of the formation of free amino acids in cocoa sedes during fermentation. *Food Chemistry* 49; 34: 161–179.

Kishino E, Ito T, Fujita K, Kiuchi Y. 2006. A mixture of the *Salacia reticulata* (kotala himbutu) aqueous extract and cyclodextrin reduces the accumulation of visceral fat mass in mice and rats with high-fat diet-induced obesity. *Journal of Nutrition* 136: 433–439.

Kissileff HR, Gruss LP, Thornton J, Jordan H. 1984. The satiating efficiency of foods. *Physiology and Behavior* 32: 319–332.

Kitahara M, Asano M, Naganawa H, Maeda K, Hamada M, Aoyagi T, Umezawa, H, Iitaka Y, Nakamura H, 1987. Valilactone, an inhibitor of esterase, produced by actinomycetes. *The Journal of Antibiotics* 40: 1647–1650.

Kniazeva M, Sieber M, McCauley S, Zhang K, Watts JL, Han M. 2003. Suppression of the ELO-2 FA elongation activity results in alterations of the fatty acid composition and multiple physiological defects, including abnormal ultradian rhythms, in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 163: 159–169.

Kniazeva M, Crawford QT, Seiber M, Wang CY, Han M. 2004. Monomethyl branched-chain fatty acids play an essential role in *Caenorhabditis elegans* development. *PLoS Biology* 2: E257.

Kobayakawa A, Suzuki T, Ikami T, Saito M, Yabe D, Seino Y. 2013. Improvement of fasting plasma glucose level after ingesting moderate amount of dietary fiber in Japanese men with mild hyperglycemia and visceral fat obesity. *Journal of Dietary Supplements* 10(2): 129-141.

Kochhar S, Gartenmann K, Juillerat MA. 2000. Primary structure of the abundant seed albumin of *Theobroma cacao* by mass spectrometry. *Journal Agricultural Food Chemistry* 48: 5593–5599.

Kochhar S, Gartenmann K, Guilloteau M, McCarthy J. 2001. Isolation and characterization of 2 S cocoa seed albumin storage polypeptide and the corresponding cDNA. *Journal Agricultural Food Chemistry* 49: 4470–4477.

Kondo K, Hirano R, Matsumoto A, Igarashi O, Itakura H. 1996. Inhibition of LDL oxidation by cocoa. *The Lancet* 348 (9040): 1514.

Kong MF, Chapman I, Goble I, Wishart J, Wittert G, Morris H, Horowitz M. 1999. Effects of oral fructose and glucose on plasma GLP-1 and appetite in normal subjects. *Peptides* 20: 545–551.

Korhonen H. 2009. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods* 177-187.

Kotilainen L, Rajalahti R, Ragasa C, Pehu E. 2006. Health enhancing foods: opportunities for strengthening the sector in developing countries. Agriculture and rural development discussion. Paper 30.

Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos, Parati G. 2010. Mechanisms of obesity-induced hypertension. *Hypertension Research* 33: 386-393.

Kristinsson HG, Rasco BA. 2000. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry (Oxford)* 36(1-2): 131-139.

Krygier K. 2007. Functional foods in Poland. In proceedings of the fourth international FFNet meeting on functional foods. Fecha de consulta: 24-02-2015.

Kuhnau J. 1976. The flavonoids: a class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Review of Nutrition and Dietetics* 24: 117–191.

Kumar SG, Rahman MA, Lee SH, Hwang HS, Kim HA, Yun JW. 2009. Plasma proteome analysis for anti-obesity and anti-diabetic potentials of chitosan oligosaccharides in ob/ob mice. *Proteomics* 9: 2149–2162.

Kwak NS, Jukes DJ. 2001. Functional Foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control* 12: 99-107.

Lafarga T, Hayes M. 2014. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Science* 98 (2): 227-239.



Lagaud GJ, Young A, Acena A, Morton MF, Barrett TD, Shankley NP. 2007. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357: 264–269.

Lam SM, Moughan PJ, Awati A, Morton HR. 2009. The influence of whey protein and glycomacropeptide on satiety in adult humans. *Physiological behaviour* 96(1): 162-168.

Lambert EV, Goedecke JH, Bluett K, Heggie K, Claassen A, Rae DE, West S, Dugas J, Dugas L, LaRosa PC, Miner J, Xia Y, Zhou Y, Kachman S, Fromm ME. 2007. Conjugated linoleic acid versus high-oleic acid sunflower oil: effects on energy metabolism, glucose tolerance, blood lipids, appetite and body composition in regularly exercising individuals. *British Journal of Nutrition* 97(5): 1001-1011.

Landsberg L, Aronne LJ, Beilin LJ, Burke V, Igel LI, Lloyd-Jones D, Sowers J. 2013. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. *Journal Clinical of Hyertension* 15 (1): 14-33.

Lang V, Bellisle F, Oppert JM, Craplet C, Bornet FR, Slama G, Guy-Grand B. 1998. Satiating effect of proteins in healthy subjects: a comparison of egg albumin, casein, gelatin, soy protein, pea protein, and wheat gluten. *American Journal of Clinical Nutrition* 67: 1197-1204.

Latif R. 2013. Chocolate/cocoa and human health: a review. *Netherlands Journal of Medicine* 71(2): 63-68.

Lawton CL, Delargy HJ, Brockman J, Smith FC, Blundell JE. 2000. The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. *British Journal of Nutrition* (83): 473-482.

Leathwood PD, Richardson DP, Sträter P, Todd PM, Van Trijp HCM. 2007. Consumer understanding of nutrition and health claims. *British Journal of Nutrition* (3): 474-484.

Lee SH, Qian Z-J, Kim SK. 2010. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 118: 96-102.

Lee RA, Balick MJ. 2007. Indigenous use of *Hoodia gordonii* and appetite suppression. *Explore* (NY) 3: 404–406.

Lee SJ, Bose S, Seo JG, Chung WS, Lim CY, Kim H. 2014 The effects of co-administration of probiotics with herbal medicine on obesity, metabolic endotoxemia and dysbiosis: a randomized double-blind controlled clinical trial. *Clinical Nutrition* 33: 973–981.

Lee DH, Kim JH, Park JS, Choi YJ, Lee JS. 2004. Isolation and characterization of a novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 25: 621-627.

Lejeune MP, Westerterp KR, Adam TC, Luscombe-Marsh ND, Westerterp-Plantenga MS. 2006. Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. *American Journal of Clinical Nutrition* 83: 89–94.

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Cross mark* 102 (31): 11070-11075.

Li GH, Qu MR, Wan JZ, You JM. 2007. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with *in vitro* angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16: 275-280.

Liendo RJ. 2005. Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolate y sus subproductos. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas. *Tecnología Poscosecha*. ([http://www.ruta.org/CDOC-Deployment/documentos/El\\_Chocolate.pdf](http://www.ruta.org/CDOC-Deployment/documentos/El_Chocolate.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Lin JK, Lin-Shiau SY. 2006. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research* 50: 211–217.

Liu J, Yu Z, Zhao W, Lin S, Wang E, Zhang Y, Hao H. 2010. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. *Food Chemistry* 122: 1159-1163.

Lo WMY, Li-Chan ECY. 2005. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from *in vitro* pepsin-pancreatin digestion of soy protein. *Journal Agriculture Food Chemistry* 53: 3369-3376.

Loke WM, Hodgson JM, Proudfoot JM, McKinley AJ, Puddey IB, Croft KD. 2008. Pure dietary flavonoids quercetin and (-)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition* 88(4): 1018-1025.

Lopaschuck GD, Folmes C, Stanley W. 2007. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circulation Research* 101: 335-347.

Lotito SB, Actis-Goretta L, Renart ML, Caligiuri M, Rein D, Schmitz HH, Steinberg FM, Keen CL, Fraga CG. 2000. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276: 945–951.

Lotito SB, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? 2006. *Free Radical Biology and Medicine* 15; 41(12): 1727-1746.

Ludewig AH, Kober-Eisermann C, Weitzel C, Bethke A, Neubert K, Gerisch B, Hutter H, Antebi A. 2004. A novel nuclear receptor/coregulator complex controls *C. elegans* lipid metabolism, larval development, and aging. *Genes Development* 18: 2120–2133.

Lusk JL, House LO, Valli C, Jaeger SR, Moore M, Morrow JL, Traill WB. 2004. Effect of information about benefits of biotechnology on consumer acceptance of genetically modified food: Evidence from experimental auctions in the United States, England and France. *European Review of Agricultural Economics* 31: 179-204.

Lusk JL, Rozan A. 2005. Consumer acceptance of biotechnology and the role of second generation technologies in the USA and Europe. *Trends in Biotechnology* 23: 386-387.

Lutz TA, Geary N, Szabady MM, Del Prete E, Scharrer E. 1995. Amylin decreases meal size in rats. *Physiology and Behavior* 58: 1197–1202.

Lutz TA. 2006. Amylinergic control of food intake. *Physiology and Behavior* 89: 465–471.

Maas MI, Hopman WP, Katan MB, Jansen JB. 1998. Release of peptide YY and inhibition of gastric acid secretion by long-chain and medium-chain triglycerides but not by sucrose polyester in men. *European Journal of Clinical Investigation* 28: 123–130.

MacLean DB, Luo LG. 2004. Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. *Brain Research* 1020: 1–11.

Mak HY, Nelson LS, Basson M, Johnson CD, Ruvkun G. 2006. Polygenic control of *Caenorhabditis elegans* fat storage. *Nature Genetics* 38: 363–368.

Mäkelä J, Niva M. 2002. Changing views of healthy eating: cultural acceptability of functional foods in Finland. Nordisk Sociologkongress, Iceland: Reykjavic.

Malik VS, Schulze, MB, Hu FB. 2006. Intake of sugarsweetened beverages and weight gain: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition* 84(2): 274-288.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79: 727-747.

Manikkam V, Vasiljevic T, Donkor ON, Mathai MC. 2015. A review of potential marine-derived hypotensial and antiobesity peptides. Aceptado en *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*.

Manyard LJ, Franklin ST. 2003. Functional foods as a value-added strategy: The commercial potential of cancer-fighting dairy products. *Review of Agricultural Economics* 25: 316-331.

Margot A, Flaschel E, Renken A. 1997. Empirical kinetic models for typic whey protein hydrolysis. *Process Biotechnology* 32(3): 217-223.

Market Analysis report. Consumer trends. Agriculture and Agri-food Canada 2009. Consumer Trends Functional Foods. ([http://www.gov.mb.ca/agriculture/market-prices-and-statistics/food-and-value-added-agriculture-statistics/pubs/consumer\\_trends\\_functional\\_foods\\_en.pdf](http://www.gov.mb.ca/agriculture/market-prices-and-statistics/food-and-value-added-agriculture-statistics/pubs/consumer_trends_functional_foods_en.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Markets and markets. 2011. Global Weight loss & Diet Management Products & Service market (<http://marketsandmarkets.com/Market-Reports/weight-loss-industry-224.html>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Markets and markets. 2013. Weight Loss/Obesity Management Market (Gastric Bypass, Meal Replacements, Nutrition & Psychological Consultancy) Worth \$361 Billion By 2017 (<http://www.prnewswire.co.uk/news-releases/weight-lossobesity-management-market-worth-361-billion-by-2017-208129511.html>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Marmonier C, Chapelot D, Louis-Sylvestre J. 2000. Effect of macronutrient content and energy density of snacks consumed in a satiety state on the onset of the next meal. *Appetite* 34: 161–168.

Mars M, Stafleu A, de Graaf C. 2012. Use of satiety peptides in assessing the satiating capacity of foods. *Physiological Behaviour* 18; 105(2): 483-488.

Martinez-Villaluenga C, Bringe NA, Berhow MA, Gonzalez de Mejia E. 2008.  $\beta$ -conglycinin embeds active peptides that inhibit lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes *in vitro*. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 56: 10533-10543.

Martinez-Villaluenga C, Rupasinghe SG, Schuler MA, Gonzalez de Mejia E. 2010. Peptides from purified soybean  $\beta$ -conglycinin inhibit fatty acid synthase by interaction with the thioesterase catalytic domain. *Federation of European Biochemical Societies Journal (FEBS)* 227: 1481-1493.

Martorell P, Forment JV, de Llanos R, Montón F, Llopis S, González N, Genovés S, Cienfuegos E, Monzó H, Ramón D. 2011. Use of *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms to study the effect of cocoa polyphenols in the resistance to oxidative stress. *Journal Agriculture Food Chemistry* 9; 59(5): 2077-2085.

Martorell P, Llopis S, González N, Montón F, Ortiz P, Genovés S, Ramón D. 2012. *Caenorhabditis elegans* as a model to study the effectiveness and metabolic targets of dietary supplements used for obesity treatment: the specific case of a conjugated linoleic acid mixture (Tonalin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(44): 11071-11079.

Martorell P, Bataller E, Llopis S, González N, Alvarez B, Montón F, Ortiz P, Ramon D, Genovés S. 2013. A Cocoa Peptide Protects *Caenorhabditis elegans* from Oxidative Stress and  $\alpha$ -Amyloid Peptide Toxicity. *PLoS One* 8(5): e63283.

Mathai ML, Naik S, Sinclair AJ, Weisinger HS, Weisinger RS. 2008. Selective reduction in body fat mass and plasma leptin induced by angiotensin-converting enzyme inhibition in rats. *International Journal of Obesity* 32: 1576-1584.

Mathur S, Devaraj S, Grundy SM, Jialal I. 2002. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *Journal of Nutrition* 132(12): 3663-3667.

Matsui T, Matsufuji H, Seki E, Osajima K, Nakashima M, Osajima Y. 1993. Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolyzates derived from sardine muscle. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 57(6): 922-925.

Matsui T, Li CH, Osajima Y. 1999. Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I converting enzyme inhibition from wheat germ. *Journal of Peptide Science* 5: 289-297.

Matsuoka T. 1997. Glycation-dependent reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *Journal of Clinical Investigation* 99: 144-150.

Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. 2011 The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 18: 629–639.

Maury E, Brichard SM. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 314: 1-16.

Mayer MA, Hocht C, Puyo A, Taira CA. 2009. Recent advances in obesity pharmacotherapy. *Current Clinical Pharmacology* 4: 53–61.

Mazza G. 2000. Alimentos funcionales. Aspectos bioquímicos y de procesado. Zaragoza, Acrabia Editorial. ISBN 9788420009179. Fecha de consulta: 22-05-2014.

McHenry L, Fritz PJ. 1992. Comparison of the structure and nucleotide sequence of vicilin genes of cocoa and cotton raise questions about vicilin evolution. *Plant Molecular Biology* 18: 1173–1176.

McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM. 2003. *C. elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Development Cell* 4: 131–142

McMath R, Forbes T. 1999. What were they thinking? Money-saving, Time – saving, Face-saving Marketing lessons you can learn from products that flopped (New York Time Business). Fecha de consulta: 14-02-2015.

Meadus WJ, MacInnis R, Dugan M. 2002. Prolonged dietary treatment with conjugated linoleic acid stimulates porcine muscle peroxisome proliferator activated receptor gamma and glutamine-fructose aminotransferase gene expression *in vivo*. *Journal of Molecular Endocrinology* 28: 79–86.

Med Market Diligence. 2011. Products, Technologies and Markets Worldwide for the clinical management of obesity, 2011-2019. Fecha de consulta: 22-07-2015.

Medina EA, Horn WF, Keim NL, Havel PJ, Benito P, Kelley DS, Nelson GJ, Erickson KL. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on circulating leptin concentrations and appetite. *Lipids* 35: 783–788.

Medina-Ramón A, Estruch R, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventos RM. 2012. The effect of polyphenol consumption in blood pressure. *Mini Review Medical Chemistry* 13(8): 1137-1149.

Mela DJ. 2001. Development and acquisition of food likes. In L.Frewer, E.Risvik, H.Schifferstein (Eds), Food Pleople and Society. A European Perspective of Consumer's Food Choices (pp9-21). Berlin: Springer-Verlag. ([http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-662-04601-2\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-662-04601-2_2)). Fecha de consulta: 14-02-2015.

Menrad K. 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering* 56: 181-188.

Mercasa. Alimentación en España 2014 ([http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion\\_2014/pdfs/pag\\_309-313\\_chocolates\\_y\\_derivados\\_cacao.pdf](http://www.mercasa-ediciones.es/alimentacion_2014/pdfs/pag_309-313_chocolates_y_derivados_cacao.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Merrill EP, Kramer FM, Cardello AV, Schutz HG. 2002. A comparison of satiety measures. *Appetite* 39: 181–183.

Merrill EP, Cardello AV, Kramer FM, Lesher LL, Schutz HG. 2004. The development of a perceived satiety index for military rations. *Food Quality and Preference* 15: 859–870.

Miglioranza Scavuzzi B, Miglioranza LH, Henrique FC, Pitelli Paroschi T, Lozovoy MA, Simão AN, Dichi I. 2015. The role of probiotics on each component of the metabolic syndrome and other cardiovascular risks. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 15: 1-12.

Mikkelsen PB, Toubro S, Astrup A. 2000. Effect of fat-reduced diets on 24-h energy expenditure: comparisons between animal protein, vegetable protein, and carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition* 72: 1135–1141.

Mikkelsen PB, Toubro S, Astrup Berti C, Riso P, Brusamolino A, Porrini M. 2005. Effect on appetite control of minor cereal and pseudocereal products. *British Journal of Nutrition* 94: 850–858.

Miller JR, Siripurkpong P, Hawes J, Majdalawieh A, Ro HS, McLeod RS. 2008. The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms. *Journal of Lipid Research* 49: 550–562.

Miller KB, Stuart DA, Smith NL, Lee CY, McHale NL, Flanagan JA, Ou B, Hurst WJ. 2006. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 31; 54(11): 4062-4068.

Min SY, Yang H, Seo SG, Shin SH, Chung MY, Kim J, Lee SJ, Lee HJ, Lee KW. 2013. Cocoa polyphenols suppress adipogenesis *in vitro* and obesity *in vivo* by targeting insulin receptor. *International Journal of Obesity* 37(4): 584-592.

Miner JL, Cederberg CA, Nielsen MK, Chen X, Baile CA. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA), body fat, and apoptosis. *Obesity Research* 9: 129–134.

Mitchell P. 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews* 41: 445-502.

Möhlig M, Spranger J, Otto B, Ristow M, Tschop M, Pfeiffer AF. 2002. Euglycemic hyperinsulinemia, but not lipid infusion, decreases circulating ghrelin levels in humans. *Journal of Endocrinological Investigation* 25: RC36–38.

Möhlig M, Koebnick C, Weickert MO, Lueder W, Otto B, Steiniger J. 2005. Arabinoxylan-enriched meal increases serum ghrelin levels in healthy humans. *Hormone Metabolic Research* 37: 303–308.

Mohr W, Landschreiber E, Severin T. 1976. Zur Spezi fi tät des Kakaoaromas. *Fette Seifen Anstrichmittel* 78: 88–95.

Montaner D, Dopazo J. 2010. Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLoS One* 5: e10348.

Monteleone P, Bencivenga R, Longobardi N, Serritella C, Maj M. 2003. Differential responses of circulating ghrelin to high-fat or high-carbohydrate meal in healthy women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 5510–5514.

Morell P, Hernando I, Llorca E, Fiszman S. 2015. Yogurts with an increased protein content and physically modified starch: rheological, structural, oral digestion and sensory properties related to enhanced satiating capacity. *Food Research International* 70: 64-73.

Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I. 2003. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 19(10): 876-879.

Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Raskin I. 2006. Effects of *Arachis hypogaea* nutshell extract on lipid metabolic enzymes and obesity parameters. *Life Sciences* 78: 2797–2803.

Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, Maebuchi M. 2004. Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 68(2): 352-359.



Morley JE, Banks WA. 2010. Lipids and cognition. *Journal of Alzheimer's disease* 20(3): 737-747.

Moro CO, Basile G. 2000. Obesity and medicinal plants. *Fitoterapia* 71: S73-S82.

Mössner J, Grumann M, Zeeh J, Fischbach W. 1992. Influence of various nutrients and their mode of application on plasma cholecystokinin (CCK) bioactivity. *Clinical Investigation* 70: 125-129.

Mukherjee M. 2003. Human digestive and metabolic lipases—a brief review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22(5): 369-376.

Mukhopadhyay A, Deplancke B, Walhout AJ, Tissenbaum HA. 2005. *C. elegans* tubby regulates life span and fat storage by two independent mechanisms. *Cell Metabolism* 2: 35-42.

Munuera JL, Rodríguez AI. 2007. Estrategias de Marketing. Un enfoque basado en el proceso de dirección. Esic. Madrid ([https://books.google.es/books/about/Estrategias\\_de\\_marketing.html?id=aj7wABSD7-MC](https://books.google.es/books/about/Estrategias_de_marketing.html?id=aj7wABSD7-MC)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Murcia JL. 2013. Alimentos Funcionales. *Distribución y consumo* 48(5). ([http://www.mercasa.es/files/multimedios/1387540447\\_Alimentos\\_funcionales\\_48-50.pdf](http://www.mercasa.es/files/multimedios/1387540447_Alimentos_funcionales_48-50.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Maureen A, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. 2003. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition* 77(6): 1466-1473.

Murray CD, le Roux CW, Gouveia C, Bassett P, Ghatei MA, Bloom SR, Emmanuel AV, Gabe SM. 2006. The effect of different macronutrient infusions on appetite, ghrelin and peptide YY in parenterally fed patients. *Clinical Nutrition* 25: 626-633.

Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, Nyssönen K, Salonen JT. 2004. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free Radical Biology and Medicine* 1; 37(9): 1351-1359.

Mutoh M, Nakada N, Matsukuma S, Ohshima S, Yoshinari K, Watanabe J, Arisawa M, 1994. Panlicins, novel pancreatic lipase inhibitors. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity. *The Journal of Antibiotics* (Tokyo) 47: 1369–1375.

Nagao K, Wang YM, Inoue N, Han SY, Buang Y, Noda T, Kouda N, Okamatsu H, Yanagita T. 2003. The 10 trans, 12cis isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats. *Nutrition* 19: 652–656.

Nakai M, Fukui Y, Asami S, Toyoda-Ono Y, Iwashita T, Shibata H, Mitsunaga T, Hashimoto F, Kiso Y. 2005. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4593–4598.

Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. 1995. Purification and characterization of Angiotensin-I converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science* 78: 777-783.

Nedvidkova J, Krykorkova I, Barták V, Papezová H, Gold PW, Alesci S, Pacak K. 2003. Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88: 1678–1682.

Nelson LH, Tucker LA. 1996. Diet composition related to body fat in a multivariate study of 203 men. *Journal American Dietetic Association* 96: 771-777.

Newgard BC, McGarry JD. 1995. Metabolic coupling factors in pancreatic –cell signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 64: 689–719.

Newgard CB, Matschinsky FM. 2001. Substrate control of insulin release. In: Jefferson LS., Cherrington AD, Goodman HM, editors. *The endocrine pancreas and regulation of metabolism*. Oxford, New York: Oxford University Press: 125–152 (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cphy.cp070205/abstract>). Fecha de consulta: 14-02-2015.

Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology* 3: 431–438.

Nielsen 2015. We are what we eat. Healthy eating trends around the world. Global Health and Wellness Report (<http://www.nielsen.com/us/en/insights/reports/2015/we-are-what-we-eat.html>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Niva M. 2000. Consumer functional foods and everyday knowledge. Conference of nutritionists meet food scientists and technologists. Fecha consulta: 14-02-2015.

Niva M. 2007. All foods affect health: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented finns. *Appetite* 48: 384-393.

Nogueira L de P, Knibel MP, Torres MR, Nogueira Neto JF, Sanjuliani AF. 2012. Consumption of high-polyphenol dark chocolate improves endothelial function in individuals with stage 1 hypertension and excess body weight. *International Journal of Hypertension* Article ID 147321: 1-9.

Nowotny H, Scott P, Gibbons M. 2001. Re-thinking Science. Knowledge and the Public in an Age of Uncertainty. Cambridge, Reino Unido, Polity Press. Fecha de consulta: 14-02-2015.

Nurk E, Refsum H, Drevon CA, Tell GS, Nygaard HA, Engedal K, Smith AD. 2009. Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. *Journal of Nutrition* 139: 120-127.

OECD Health Data 2011 (<http://www.oecd.org/els/health-systems/49084488.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

OECD Obesity update 2012 (<http://www.oecd.org/health/49716427.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

OECD Obesity update 2014 (<http://www.oecd.org/els/health-systems/Obesity-Update-2014.pdf>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Ishihara K, Fushiki T. 2001. A single oral administration of conjugated linoleic acid enhanced energy metabolism in mice. *Lipids* 36: 583–587.

Ohta T, Iwashita A, Sasaki S, Kawamura Y. 1997. Antihypertensive action of the orally administered protease hydrolysates of chum salmon head and their angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Food Science and Technology International* 3: 339-343.

Ono Y, Hattori E, Fukaya Y, Imai S, Ohizumi Y. 2006. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* 106: 238–244.

Ono S, Hosokawa M, Miyashita K, Takahashi K. 2006. Inhibition properties of dipeptides from salmon muscle hydrolysate on angiotensin I-converting enzyme. *International Journal of Food Science and Technology* 41 (4): 383-386.

Ortega FJ, Fernandez Real JM. 2013. Inflammation in adipose tissue and fatty acid anabolism: when enough is enough! *Hormone and Metabolic Research* 45(13): 1009-1019.

Ortinou LC, Hoertel HA, Douglas SM, Leidy HJ. 2014. Effects of high-protein vs. high-fat snacks on appetite control, satiety, and eating initiation in healthy women. *Nutrition Journal* 13: 97.

Osakabe N, Baba S, Yasuda A, Iwamoto T, Kamiyama M, Takizawa T, Itakura H, Kondo K. 2001. Daily cocoa intake reduces the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation as demonstrated in healthy human volunteers. *Free Radical Research* 34: 93-99.

Overduin J, Guerin-Deremaux L, Wils D, Lambers TT. 2015. NUTRALYST<sup>†</sup> pea protein: characterization of *in vitro* gastric digestion and *in vivo* gastrointestinal peptide responses relevant to satiety. *Food and Nutrition Research* 59: 25622.

Packaged Facts. 2013. Weight management trends in the U.S. (<http://www.marketresearch.com/Packaged-Facts-v768/Weight-Management-Consumer-Mindsets-8351387/>). Fecha de consulta: 12-12-2014.

Pal S, Ellis V. 2010. The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals. *Obesity* 18(7): 1354-1359.

Palmer J, Walter R, Ensink J. 1975. Arginine-stimulated acute phase of insulin and glucagon secretion in normal man. *Diabetes* 24: 735-740.

Pannala AS, Chan TS, O'Brien PJ, Rice-Evans C. 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282: 1161-1168.

Park Y, Albright KJ, Liu W, Storkson JM, Cook M, Pariza MW. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32: 853-858.

Park MY, Lee KS, Sung MK. 2005. Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng, and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\gamma$ , and LPL mRNA expressions. *Life Sciences* 77: 3344-3354.

Park S, Bae JH. 2015. Probiotics for weight loss: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Research* 35(7): 566-575.

Pearson D, Holt RR, Rein D, Paglieroni T, Schmitz HH, Keen CL. 2005. Flavonols and platelet reactivity. *Clinical and Developmental Immunology* 12(1): 1-9.

Pedersen NL, Nagain-Domaine C, Mahe S, Chariot J, Roze C, Tome D. 2000. Caseinomacropeptide specifically stimulates exocrine pancreatic secretion in the anesthetized rat. *Peptides* 21: 1527–1535.

Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millán F, Vioque J. 2002. Utilisation of chickpea protein isolates for production of peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82 (9): 960-965.

Peng Y, West GE, Wang C. 2006. Consumer attitudes and acceptance of CLA-enriched dairy products. *Canadian Journal of Agricultural Economics* 54: 663-684.

Pettipher GL. 1999. The extraction and partial purification of cocoa storage proteins. *Café Cacao Thé* 34: 23–26.

Picó C, Oliver P, Priego T, Sánchez J, Palou A. 2006. Alimentos funcionales y obesidad: estrategias, eficacia y seguridad. *Revista Española de Obesidad* 4(3): 156-174.

Piggott J. 1995. Design questions in sensory and consumer science. *Food Quality and Preference* 6: 217-220.

Pihlanto-Leppälä A, Koskinen P, Piilola K, Tupasela T, Korhonen H. 2000. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory properties of whey protein digests: concentration and characterization of active peptides. *Journal Dairy Research* 67(1): 53-64.

Pilichiewicz AN, Little TJ, Brennan IM, Meyer JH, Wishart JM, Otto B, Horowitz M, Feinle-Bisset, C. 2005. Effects of load, and duration, of duodenal lipid on antropyloroduodenal motility, plasma CCK and PYY, and energy intake in healthy men. *American Journal Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 290: R668–677.

Piqueras-Fiszman B, Spence C. 2012. The weight of the container influences expected satiety, perceived density, and subsequent expected fullness. *Appetite* 58(2): 559-562.

Poirier H, Shapiro JS, Kim RJ, Lazar MA. 2006. Nutritional supplementation with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue. *Diabetes* 55: 1634–1640.

Poppitt SD, McCormack D, Buffenstein R. 1998. Short-term effects of macronutrient preloads on appetite and energy intake in lean women. *Physiology and Behavior* 64: 279–285.

Poppitt SD, Keogh GF, Mulvey TB, Phillips A, McArdle BH, MacGibbon AK, Cooper GJ. 2004. Effect of moderate changes in dietary fatty acid profile on postprandial lipaemia, haemostatic and related CVD risk factors in healthy men. *European Journal of Clinical Nutrition* 58: 819–827.

Porrini M, Crovetti R, Riso P, Santangelo A, Testolin G. 1995. Effects of physical and chemical characteristics of food on specific and general satiety. *Physiology and Behavior* 57(3): 461–468.

Porrini M, Santangelo A, Crovetti R, Riso P, Testolin G, Blundell JE. 1997. Weight, protein, fat and timing of preloads affect food intake. *Physiology and Behavior* 62: 563–570.

Porter M. 1985. Competitive advantage: New York:free press,pp 4-8, 234-236 (<http://www.hbs.edu/faculty/Pages/item.aspx?num=193>). Fecha de consulta: 20-12-2014.

Pouliot MC, Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. 1991. Regional variation in adipose tissue lipoprotein lipase activity: association with plasma high density lipoprotein levels. *European Journal of Clinical Investigation* 21: 398–405.

Poulsen JB. 1999. Danish consumers' attitudes towards functional foods. MAPP working paper 62. Aarhus: The Aarhus school of business (<http://econpapers.repec.org/paper/hhbaarmap/0062.htm>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Prentice AM, Poppitt SD. 1996. Importance of energy density and macronutrients in the regulation of energy intake. *International Journal of Obesity* 20: S18–S23.

Preza AM, Jaramillo ME, Puebla AM, Mateos JC, Hernández R, Lugo E. 2010. Antitumor activity against murine lymphoma L5178Y model of proteins from cocoa (*Theobroma cacao* L) seeds in relation with *in vitro* antioxidant activity. *BCM Complementary and Alternative Medicine* 10: 61.

Prior LJ, Eikelis N, Armitage JA, Davern PJ, Burke SL, Montani JP, Barzel B, Head GA. 2010. Exposure to a high-fat diet alters leptin sensitivity and elevates renal sympathetic nerve activity and arterial pressure in rabbits. *Hypertension* 55: 862–868.

Profenno LA, Porsteinsson AP, Faraone SV. 2010. Meta-analysis of Alzheimer's disease risk with obesity, diabetes and related disorders. *Biological psychiatry* 67(6): 505-512.

Quintanilla I. 2008. Las técnicas cualitativas frente a las cuantitativas: Una polémica innecesaria. Métodos de investigación en psicología económica y del consumidor (pp. 131-163). Valencia: Promolibro.

Quiñones M, Sánchez D, Muguerza B, Moulay L, Laghi S, Miguel M, Aleixandre A. 2010. Long-term intake of CocoanOX attenuates the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 122 (4): 1013-1019.

Rahmouni K, Haynes WG, Morgan DA, Mark AL. 2002. Selective resistance to central neural administration of leptin in agouti obese mice. *Hypertension* 39: 486-490.

Randle PJ. 1998. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metabolic Review* 14: 263-268.

Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B, Pérusse L, Bouchard C. 2012. The human obese gene map: the 2005 update. *Obesity* 14(4): 529-644.

Rankinen T, Sarzynski MA, Ghosh S, Bouchard C. 2015. Are there genetic paths common to obesity, cardiovascular disease outcomes, and cardiovascular risk factors? *Circulation Research* 909-922.

Raoult D. 2009. Probiotics and obesity: a link? *Nature Reviews Microbiology* 7: 616.

Rayalam S, Della-Fera MA, Baile CA. 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19: 717-726.

Reda TK, Geliebter A, Pi-Sunyer FX. 2002. Amylin, food intake, and obesity. *Obesity Research* 10: 1087-1091.

Reid M, Hetherington M. 1997. Relative effects of carbohydrates and proteins on satiety: a review of methodology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 21: 295-308.

Ricci-Cabello I, Herrera MO, Artacho R. 2012. Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutritional Review* 70(4): 241-255.

Ried K, Sullivan T, Fakler P, Frank OR, Stocks NP. 2010. Does chocolate reduce blood pressure? A meta-analysis. *BMC Medicine* 8:39.

Roberfroid MB. 2000a. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *American Society for Clinical Nutrition* 7: S1660-S1664.

Roberfroid MB. 2000b. An european consensus of scientific concepts of functional foods. *Nutrition* 16: 689-691.

Roberts JA, Bacon DR. 1997. Exploring the subtle relationships between environmental concern and ecologically conscious consumer behaviour. *Journal of Business Research* 40: 79-89.

Rohsius C, Matissek R, Lieberei R. 2006. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *European Food Research and Technology* 222: 432-438.

Rolls BJ, Gnizak N, Summerfelt A, Laster LJ. 1988. Food intake in dieters and nondieters after a liquid meal containing medium-chain triglycerides. *American Journal Clinical Nutrition* 48: 66-71.

Rolls BJ, Castellanos VH, Halford JCG, Kilara A, Panyam D, Pelkman CL, Smith GP and Thorwart ML. 1998. Volume of food consumed affects satiety in men. *American Journal of Clinical Nutrition* 67: 1170-1177.

Rowan C. 2000. Packaging by design. *Food Engineering International* 2: 19-25.

Rozin P, Levine E, Stoess C. 1991. Chocolate craving and liking. *Appetite* 17(3): 199-212.

Rubin R. 2012. New diet drug lorcaserin wins vote from FDA panel. WebMD News Archive. ([www.webmd.com/diet/news/20120510/new-diet-drug-lorcaserin-wins-vote-from-fda-panel](http://www.webmd.com/diet/news/20120510/new-diet-drug-lorcaserin-wins-vote-from-fda-panel)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Russell K, Delahunty C. 2004. The effect of viscosity and volumen on pleasantness and satiating power of rice milk. *Food Quality and Preference* 15(7-8): 743-750.

Russo P, Lauria F, Siani A. 2010. Heritability of body weight: moving beyond genetics. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 20: 691-697.

Saarela M. 2011. Functional Foods and obesity: Concept to Product. Woodhead Publishing Limited.

Salmenkallio-Marttila M, Due A, Gunnarsdottir I, Karhunen L, Saarela M, Lyly M. 2009. Satiety, Weight Management and foods. Literature review. Nordic Innovation Center([http://www.nordicinnovation.org/Global/\\_Publications/Reports/2009/06078\\_sa](http://www.nordicinnovation.org/Global/_Publications/Reports/2009/06078_sa)



tiety\_weight\_management\_and\_foods\_literature\_review\_web.pdf). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Salvador J, Frühbech G. 2005. Regulación de la ingesta alimentaria: una perspectiva clínica. *Endocrinología y Nutrición* 52(8): 404-430.

Sánchez J, Oliver P, Palou A, Pico C. 2004. The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology* 145: 5049-5055.

Sánchez M, Darimont C, Drapeau V, Emady-Azar S, Lepage M, Rezzonico E. 2014. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 13724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *British Journal of Nutrition* 111: 1507–1519.

Sánchez-Rabaneda F, Jaurequi O, Casals I, Andres-Lacueva C, Izquierdo-Pulido M, Lamuela-Raventos RM. 2003. Liquid chromatographic/electron spray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Mass Spectrometry* 38: 35–42.

Sanggaard KM, Holst JJ, Rehfeld JF, Sandstrom B, Raben A, Tholstrup T. 2004. Different effects of whole milk and a fermented milk with the same fat and lactose content on gastric emptying and postprandial lipaemia, but not on glycaemic response and appetite. *British Journal of Nutrition* 92: 447–459.

Sannier F, Piot JM, Guillochon D. 1994. Stability of a mineral membrane ultrafiltration reactor for peptide hydrolysis of hemoglobin. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 61(1): 43-47.

Sartor MA, Leikauf GD, Medvedovic M. 2009. LRpath: a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. *Bioinformatics* 25: 211–217.

Sarzani R, Salvi F, Dessi P, Rappelli A. Renin-angiotensin system, natriuretic peptides, obesity, metabolic syndrome, and hypertension: an integrated view in humans. 2008. *Journal Hypertension* 26: 831-843.

Sassi F. 2010. Organization for economic cooperation and development report: obesity and the economics of prevention: fit not fat. OECD Health Data 2011.

Sato M, Hosokawa T, Yamaguchi T, Nakano T, Muramoto K, Kahara T, Funayama K, Kobayashi A, Nakano T. 2002. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in

spontaneously hypertensive rats. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 50(21): 6245-6252.

Satory DL, Smith SB. 1999. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation but stimulates lipid filling of murine 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Nutrition* 129: 92–97.

Sawka K, Fiora B. 2003. The four analytical techniques every analyst must know: 2. Porter's five forces analysis, competitive intelligence magazine pg57 (<http://www.slideshare.net/dedenassyafei/kotler-pom-15einppt03>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Schaefer C, Waesche A. 2003. Bioactive whey protein hydrolysates and peptide fraction obtained by hydrolysis with proteases. Germany (Fraunhofer-Gesellschaft zur Foerderung der Angewandten Forschung EV) WO. 200305983. Fecha de consulta: 14-05-2015.

Scheibehenne B, Todd PM, Wansink B. 2010. Dining in the dark. The importance of visual cues for food consumption and satiety. *Appetite* 55(3): 710-713.

Schewe T, Kühn H Sies H. 2002. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-Lipoxygenase. *British Journal of Nutrition* 132: 1825-1829.

Schnorr O, Brossette T, Momma TY, Kleinbongard P, Keen CL, Schroeter H Sies H. 2008. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells *in vitro* and in erythrocytes *in vivo*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 15; 476(2): 211-215.

Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH Kelm M. 2006. (–)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 103(4): 1024-1029.

SEEDO (Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad) 2000. (<http://www.seedo.es/index.php/que-hacemos/documentacion-de-consenso>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Segula D. 2014. Complications of obesity in adults: A short review of the literature. *Malawi Medical Journal* 26(1): 20-24.

Selmi C, Mao TK, Keen CL, Harold HS, Gershwin EM. 2006. The anti-inflammatory properties of cocoa flavonols. *Journal Cardiovascular and Pharmacology* 47 (2): S163-S171.

Selmi C, Cocchi CA, Lanfredini M, Keen CL and Gershwin EM. 2008. Chocolate at heart: the anti-inflammatory impact of cocoa flavonols. *Molecular Nutrition and Food Research* 52 (11): 1340-1348.

Serafini M, Bugianesi R, Maiani G, Valtuena S, De Santis S, Crozier A. 2003. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 28: 424 (6952): 1013.

Sghir A, Gramet G, Suau A, Rochet V, Pochart P, Doré J. 2000. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2263–2266.

Sharafedinov KK, Plotnikova OA, Alexeeva RI, Sentsova TB, Songisepp E, Stsepetova J. 2013. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients—a randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Journal of Nutrition* 12: 138.

Sharma S, Singh R, Rana S. 2011. Bioactive peptides: a review. *International Journal Bioautomation* 15(4): 223-250.

Shepherd R, Sparks P, Raats M. 1991. The effects of information on sensory ratings and preferences: The importance of attitudes. *Food Quality and Preference* 3: 147-155.

Shiia T, Nakazato M, Mizuta M, Date Y, Mondal MS, Tanaka M, Nozoe SI, Hosoda H, Kangawa K, Matsukura S. 2002. Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87: 240–244.

Shimada Y, Goto H, Kogure T, Shibahara N, Sakakibara I, Sasaki H, Terasawa K. 2001. Protective effect of phenolic compounds isolated from the hooks and stems of *Uncaria sinensis* on glutamate-induced neuronal death. *The American Journal of Chinese Medicine* 29(1): 173-180.

Shimoda H, Seki E, Aitani M, 2006. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6, 9.

Shine A, O'Reilly S, O'Sullivan K. 1997. Consumer attitudes to nutrition labelling. *British Food Journal* 99 (8): 283-289.

Sicras-Mainar A, Gil J, Mora T, Navarro-Artieda R, Ayma J. 2012. Healthcare use and costs associated with obesity in Badalona, Spain: a study protocol. *BMJ Open* 2:e000547.doi:10.1136/bmjopen-2011-000547(<http://www.researchgate.net/publication/22176871212>). Healthcare \_use\_and\_costs\_associated\_with\_obesity\_in\_badalona\_Spain\_a\_study\_protocol). Fecha de consulta: 22-07-2015.

Simoneau C. 1999. Detection and quantification of cocoa butter equivalents in chocolate model systems: analysis of triglyceride profiles by high resolution GC. *Food Chemistry* 65: 111-116.

Siro I, Kapolna E, Kapolna B, Lugasi A. 2008. Functional Foods. Product development, marketing and consumer acceptance: A review. *Appetite* 51(3): 456-467.

Sisk MB, Hausman DB, Martin RJ, Azain MJ. 2001. Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. *Journal of Nutrition* 131: 1668-1674.

Slanc P, Doljak B, Mlinaric A, Strukelj B. 2004. Screening of wood damaging fungi and macrofungi for inhibitors of pancreatic lipase. *Phytotherapy Research* 18: 758–762.

Slanc P, Doljak B, Kreft S, Lunder M, Janes D, Strukelj B. 2009. Screening of selected food and medicinal plant extracts for pancreatic lipase inhibition. *Phytotherapy Research* 23(6): 874-877.

Slovacek L, Pavlik V, Slovackova B. 2008. The effect of sibutramine therapy on occurrence of depression symptoms among obese patients. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 18: e43–e44.

Smyth GK. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3: Article 3.

Solah VA, Kerr DA, Adikara CD, Meng X, Binns CW, Zhu K, Devine A, Prince RL. 2010. Differences in satiety effects of alginate- and whey protein-based foods. *Appetite* 54(3): 485-491.

Sorensen TL, Madkor SA, Mims S. 2004. Whey protein hydrolysate. Den (Novozymes A/S) US 20033224096.

Sorond FA, Lipsitz LA, Hollenberg NK, Fisher ND. 2008. Cerebral blood flow response to flavanol-rich cocoa in healthy elderly humans. *Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment* 4: 433-440.

Sowers JR. Hypertension, angiotensin II and oxidative stress. 2002. *New England Journal of Medicine* 346: 1999–2001.

Spencer JP. 2001. Epicatechin and its *in vivo* metabolite, 3'-O-methyl epicatechin, protect human fibroblasts from oxidative-stress induced cell death involving caspase-3-activation. *Biochemical Journal* 354: 493-500.

Spencer JP. 2009. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanism. *Genes and Nutrition* 4(4): 243-250.

Spencer ME, Hodge R. 1991. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the major albumin of *Theobroma cacao*. *Planta* 183: 528–535.

Spencer ME, Hodge R. 1992. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the major storage proteins of *Theobroma cacao*: Identification of the proteins as members of the vicilin class of storage proteins. *Planta* 186: 567–576.

Srinivasan S. 2015. Regulation of body fat in *Caenorhabditis elegans*. *Annual Review of Physiology* 77: 161-178.

Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. 2005. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological Reviews* 85 (3): 1093-1129.

Stanton C, Ross P, Fitzgerald G, Van Sinderen D. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 198–203.

Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD. 1997a. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *Journal of Clinical Investigation* 100: 398–403.

Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB. 1997b. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *Journal of Clinical Investigation* 97: 2728–2735.

Steinberger J, Daniels SR. 2003. Obesity, Insulin resistance, diabetes and cardiovascular risk in children. *Circulation* 107: 1448-1453.

Stewart-Knox B, Mitchell P. 2003. What separates the winners and the losers in new food product development? *Trends in Food Science and Technology* 14: 58-64.

St-Onge MP, Jones PJ. 2002. Physiological effects of medium-chain triglycerides: potential agents in the prevention of obesity. *Journal of Nutrition* 132: 329-332.

Stubbs RJ, van Wyk MCW, Johnstone AM, Harbron CG. 1996. Breakfast high in protein, fat or carbohydrate: effect on within-day appetite and energy balance. *European Journal of Clinical Nutrition* 50: 409–417.

Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson G, Collins MD, Doré J. 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4799–4807.

Sudgen MC, Holness MJ. 1994. Interactive regulation of the pyruvate dehydrogenase complex and the carnitine palmitoyltransferase system. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)* 8: 54-61.

Suetsuna K. 1998. Isolation and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *The Journal of Nutritional Biochemistry* 9: 415-419.

Sugiyama H, Akazome Y, Shoji T, Yamaguchi A, Yasue M, Kanda T, Ohtake Y. 2007. Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30; 55(11): 4604-4609.

Szakaly Z, Sente V, Szigeti O. 2004. Consumer evaluation of functional foods in Hungary. In proceedings of the sixth international conference on food physics and dairy sciences. Fecha de consulta: 14-07-2014.

Sze JY, Victor M, Loer C, Shi Y, Ruvkun G. 2000. Food and metabolic signaling defects in a *Caenorhabditis elegans* serotonin-synthesis mutant. *Nature* 403: 560–564.

Tai H, McHenry L, Fritz PJ, Furtek DB. 1991. Nucleic acid sequence of a 21 KDa cocoa seed protein with homology to the soybean trypsin inhibitor (Kunitz) family of protease inhibitors. *Plant Molecular Biology* 16: 913–915.

Takao I, Fujii S, Ishii A, Han LK, Kumao T, Ozaki K. 2006. Effects of manooligosaccharides from coffee mannan on fat storage in mice fed a high fat diet. *Journal of Health Sciences* 52: 333–337.

Tannaous dit El Khoury D, Obeid O, Azar ST, Hwalla N. 2006. Variations in postprandial ghrelin status following ingestion of high-carbohydrate, high-fat, and highprotein meals in males. *Annals of Nutrition and Metabolism* 50: 260–269.

Taubert S, Van Gilst MR, Hansen M, Yamamoto KR. 2006. A Mediator subunit, MDT-15, integrates regulation of fatty acid metabolism by NHR-49-dependent and -independent pathways in *C. elegans*. *Genes Development* 20: 1137–1149.

Taubert D, Berkels R, Roesen R, Klaus W. 2003. Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* 27; 290(8): 1029-1030.

Taubert D, Roesen R, Schömig E. 2007a. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Archives of Internal Medicine* 9; 167(7): 626-634.

Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schömig E. 2007b. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* 4; 298(1): 49-60.

Teratanavat R, Hooker NH. 2006. Consumer valuations and preference heterogeneity for a novel functional food. *Journal of Food Science* 7: S533-S541.

Terpstra AH, Beynen AC, Everts H, Kocsis S, Katan MB, Zock LP. 2002. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *Journal of Nutrition* 132: 940-945.

Thiel R, Blaut M. 2005. An improved method for the automated enumeration of fluorescently labelled bacteria in human faeces. *Journal of Microbiological Methods* 61: 369-379.

Tholstrup T, Raff M, Straarup EM, Lund P, Basu S, Bruun JM. 2008. An oil mixture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and *in vivo* lipid peroxidation compared with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *Journal of Nutrition* 138: 1445-1451.

Thurairajah PH, Syn WK., Neil DA, Stell D, Haydon G. 2005. Orlistat (xenical)-induced subacute liver failure. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17: 1437-1438.

Tomoda H, Namatame I, Omura S. 2002. Microbial metabolites with inhibitory activity against lipid metabolism. *Proceedings of the Japan Academy* 78: 217-240.

Tovar-Palacio C, Potter SM, Hafermann JC, Shay NF. 1998. Intake of Soy Protein and Soy Protein Extracts Influences Lipid Metabolism and Hepatic Gene Expression in Gerbils. *Journal of Nutrition* 839-842.

Tripolt NJ, Leber B, Blattl D, Eder M, Wonisch W, Scharnagl H. 2013. Short communication: effect of supplementation with *Lactobacillus casei* Shirota on insulin sensitivity,  $\beta$ -cell function, and markers of endothelial function and inflammation in subjects with metabolic syndrome—a pilot study. *Journal of Dairy Science* 96: 89-95.

Trowell H. 1976. Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *American Journal of Clinical Nutrition* 29(4): 417-427.

Tsuchiya A, Almiron-Roig E, Lluch A, Guyonnet D, Drewnowski, A. 2006. Higher satiety ratings following yogurt consumption relative to fruit drink or dairy fruit drink. *Journal of the American Dietetic Association* 106(4): 550-557.

Tuorila H, Cardello AV. 2002. Consumer response to an off-flavour in juice in the presence of a specific health claim. *Food Quality and Preference* 13: 561-569.

Turconi G, Bazzano R, Caramella R, Porrini M, Crovetti R, Lanzola E. 1995. The effects of high intakes of fibre ingested at breakfast on satiety. *European Journal of Clinical Nutrition* 49: 281–285.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444 (7122): 1027-1031.

Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3(4): 213-223.

Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 22; 457 (7228): 480-484.

Tzokas N. 2000. Critical information and the quest for customer relevant NPDP processes Unpublished report for the EU. Product Strategy And Management.

Uhe AM, Collier GR, O’Dea K. 1992. A comparison of the effects of beef, chicken and fish protein on satiety and amino acid profiles in lean male subjects. *Journal of Nutrition* 122(3): 467-472.

Ullrich IH, Albrink MJ. 1985. The effect of dietary fiber and other factors on insulin response: role in obesity. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 5: 137–155.

Umezawa H, Aoyagi T, Uotani K, Hamada M, Takeuchi T, Takahashi S. 1980. Ebelactone, an inhibitor of esterase, produced by actinomycetes. *Journal of Antibiotics* 33: 1594–1596.

Urala N, Arvola A, Lähteenmäki L. 2003. Strength of health related claims and their perceived advantage. *International Journal of Food Science and Technology* 38: 815-826.



Urala N, Lähteenmäki L. 2004. Attitudes behind consumer's willingness to use functional foods. *Food Quality and Preference* 15: 793-803.

Urala N, Lähteenmäki L. 2007. Consumers' changing attitudes towards functional foods. *Food Quality and Preference* 18: 1-12.

US Foods and Drug administration. FDA approves Belviq to treat some overweight or obese adults. Press release July 17, 2012. ([www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncement/ucm309993.htm](http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncement/ucm309993.htm)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

US Foods and Drug administration. FDA approves weight management drug Qsymia. Press release July 17, 2012. [www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncement/ucm312468.htm](http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncement/ucm312468.htm). Accessed August 28, 2013. Fecha de consulta: 22-07-2015.

Van Heerden FR, Marthinus Horak R, Maharaj VJ, Vleggaar R, Senabe JV, Gunning PJ. 2007. An appetite suppressant from Hoodia species. *Phytochemistry* 68: 2545–2553.

Van Heerden FR. 2008. Hoodia gordonii: a natural appetite suppressant. *Journal of Ethnopharmacology* 119: 434–437.

Van Hulst KL, Nieuwenhuis MG, Höppener JW, Lips CJ, Blankenstein MA. 1996. Lack of islet amyloid polypeptide/amylin-immunoreactivity in urine collected from healthy volunteers after ingestion of a carbohydrate-rich meal. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* 104: 177–179.

Van Kleef E, van Trijp HCM and Luning P, Jongen WMF. 2002. Consumer – oriented functional food development: How well functional disciplines reflect the “voice of the consumer”? *Trends in Food Science and Technology* 13: 93-101.

Van Kleef E, van Trijp HCM, Luning P. 2005. Functional foods: health claim food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. *Appetite* 44: 299-308.

Van Tilbeurgh H, Sarde L, Verger R, Cambillan C. 1992. Structure of the pancreatic lipase pro-colipase complex. *Nature* 10; 359 (6391): 159-162.

Vartanian LR, Schwartz MB, Brownell KD. 2007. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Public Health* 97(4): 667-675.

Veldhuizen MG, Nachtigal DJ, Flammer LJ, de Araujo IE, Small, DM. 2013. Verbal descriptors influence hypothalamic response to low-calorie drinks. *Molecular Metabolism* 2(3): 270-280.

Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Muller F. 2003. Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426: 620.

Verbeke W. 2005. Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic cognitive and attitudinal determinants. *Food Quality and Preference* 16(1): 45-47.

Verbeke W. 2006. Functional foods: consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Quality and Preference* 17: 126-131.

Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shuta D, Samman N, Agbor GA. 2006. Chocolate is a powerful *ex vivo* and *in vivo* antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American Diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 18; 54(21): 8071-8076.

Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Economou E, Andreadou I, Stefanadis C. 2005. Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *American Journal of Hypertension* 18(6): 785-791.

Voigt J, Biehl B, Kamaruddin S. 1993. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. *Food Chemistry* 47: 145–151.

Voigt J, Biehl B. 1995. Precursors of the cocoa specific aroma components are derived from the vicilin-class (7S) globulin of the cocoa seeds by proteolytic processing. *Botanic Acta* 108: 283–289.

Voigt J, Biehl B, Heinrichs H, Kamaruddin S, Marsoner GG, Hugi A. 1994. In-vitro formation of cocoa-specific aroma precursors: aroma-related peptides generated from cocoa-seed protein by co-operation of an aspartic endoprotease and a carboxypeptidase. *Food Chemistry* 49: 173–180.

Vuksan V, Panahi S, Lyon M, Rogovik AL, Jenkins AL, Leiter LA. 2009. Viscosity of fiber preloads affects food intake in adolescents. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases* 19(7): 498-503.

Waldram A, Holmes E, Wang Y, Rantalainen M, Wilson ID, Tuihy KM, McCartney AL, Gilson GR, Nicholson JK. 2009. Top-down systems biology modeling of host metabotype-microbiome associations in obese rodents. *Journal of Proteome Research* (5): 2361-2375.

Wang JF. 2000. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *Journal of Nutrition* 130: 2115S-2119S.

Wang JF. 2001. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 74: 596-602.

Wang Y, Beydoun MA, Liang L, Caballero B, Kumanyika SK. 2008. Will All Americans Become Overweight or Obese? Estimating the Progression and Cost of the US Obesity Epidemic. *Obesity* 16(10): 2323-2330.

Wang J, Hu J, Cui J, Bai X, Du Y, Miyaguchi Y, Lin, B. 2008. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 111: 302-308.

Wang-Polagruto JF, Villablanca AC, Polagruto JA, Lee L, Holt RR, Schrader HR, Ensunsa JL, Steinberg FM, Schmitz HH, Keen CL. 2006. Chronic consumption of flavanol-rich cocoa improves endothelial function and decreases vascular cell adhesion molecule in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 47 (2): 177-186.

Wansink B, Westgren RE, Cheney MM. 2005. Hierarchy of nutritional knowledge that relates to the consumption of a functional food. *Nutrition* 21: 264-268.

Watson RR, Preedy VR, Zibadi S. 2013. Chocolate in Health and Nutrition. *Nutrition and Health*. Series Editor: Adrienne Bendich. *Humana Press* ISBN 978-1-61779-802-3 ISBN 978-1-61779-803-0 (eBook).

Watts JL, Browse J. 2002. Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 99: 5854–5859.

Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H. 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *Journal of Antibiotics* 40: 1081–1085.

Weich I, Saunders K, Read NW. 1985. Effect of ileal and intravenous infusions of fat emulsions on feeding and satiety in human volunteers. *Gastroenterology* 89: 1293-1297.

Weickert MO, Spranger J, Holst JJ, Otto B, Koebnick C, Mohlig M, Pfeiffer AF. 2006. Wheat-fibre-induced changes of postprandial peptide YY and ghrelin responses are not associated with acute alterations of satiety. *British Journal of Nutrition* 96: 795–798.

Weisinger RS, Begg DP, Chen N, Jois M, Mathai ML, Sinclair AJ. 2007. The problem of obesity: Is there a role for antagonists of the renin-angiotensin system? *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16: 359-367.

West DB, Blohm FY, Truett AA, DeLany JP. 2000. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *Journal of Nutrition* 130: 2471–2477.

West SG, McIntyre MD, Piotrowski MJ, Poupin N, Miller DL, Preston AG, Wagner P, Groves LF and Skulas-Ray AC. 2014. Effects of dark chocolate and cocoa consumption on endothelial function and arterial stiffness in overweight adults. *British Journal of Nutrition* 111(4): 653-661.

Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MPGM, Nijs I, Ooijen M, Kovacs EMR. 2004. High protein intake sustains weight maintenance after body weight loss in humans. *International Journal of Obesity* 28: 57–64.

Weststrate JA, van Poppel G, Verschuren PM. 2002. Functional foods, trends and future. *British Journal of Nutrition* 88 (2): S233–S235.

WHO 2012. Enfermedades cardiovasculares. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

WHO, Plan de acción 2013-2020. ([http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/15032013\\_updated\\_revised\\_draft\\_action\\_plan\\_spanish.pdf](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/15032013_updated_revised_draft_action_plan_spanish.pdf)). Fecha de consulta: 22-07-2015.

WHO 2014. Global prevalence of obesity in men (<http://www.businessinsider.com/world-health-organization-obesity-maps-2015-1>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

WHO 2015. Obesity and overweight. Fact sheet nº 311. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>). Fecha de consulta: 22-07-2015.

William RJ, Spencer JP. 2012. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radical Medicine and Biology* 52(1): 35-45.

Wofford MR, Anderson DC Jr, Brown CA, Jones DW, Miller ME, Hall JE. 2001. Antihypertensive effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic blockade in obese and lean hypertensive subjects. *American Journal of Hypertension* 14: 694–698.

Wollgast J. 2000. Review on polyphenols in Theobroma cacao: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International* 33: 423-447.

Woodard GA, Encarnacion B, Downey JR, Peraza J, Chong K, Hernandez-Boussard T. 2009. Probiotics improve outcomes after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a prospective randomized trial. *Journal of Gastrointestinal Surgery* 13: 1198–1204.

Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillon WS, Ghatei MA, Bloom SR. 2001. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism* 86: 5992.

Wrick KL. 1995. Consumer issues and expectations for functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35: 167-173.

Yach D, Stuckler D, Brownell K. 2006. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nature Medicine* 12(1): 62-66.

Yamasaki M, Ikeda A, Oji M, Tanaka Y, Hirao A, Kasai M, Iwata T, Tachibana H, Yamada K. 2003. Modulation of body fat and serum leptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed various fat-level diets. *Nutrition* 19: 30–35.

Yang Z, Hall HG. 2008. The Financial Burden of Overweight and Obesity among Elderly Americans: The Dynamics of Weight, Longevity, and Health Care Cost. *Health Services Research Journal* 43(3): 849-868.

Yeddes N, Cherif JK, Ayadi MT. 2014. Comparative Study of Antioxidant Power, Polyphenols, Flavonoids and Betacyanins of Peel and Pulp of Three Tunisian *Opuntia* Forms. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 17(5): 650-658.

Yeomans MR Chambers L. 2011. Satiety-relevant sensory qualities enhance the satiating effects of mixed carbohydrate-protein preloads. *American Journal of Clinical Nutrition* 94 (6): 1410-1417.

Yokoyama K, Chiba H, Yoshikawa M. 1992. Peptide inhibitors for angiotensin I converting enzyme from thermolysin digest of dried bonito. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56: 1541-1545.

Yoshinari K, Aoki M, Ohtsuka T, Nakayama N, Itezono Y, Mutoh M, Watanabe J, Yokose K. 1994. Panclicins, novel pancreatic lipase inhibitors. II. Structural elucidation. *The Journal of Antibiotics* (Tokyo) 47: 1376–1384.

Yu Z, Zhao W, Liu J, Lu J, Chen F. 2011. QIGLF, a novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide from egg white protein. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 91: 921-926.

Yun JW. 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. *Phytochemistry* 71: 1625–1641.

Yvon M, Beucher S, Guilloteau P, Le Hueron-Luron I, Lorring T. 1994. Effects of caseinmacropeptide (CMP) on digestion regulation. *Reproduction Nutrition Development* 34: 527-537.

Zambell KL, Keim NL, Van Loan MD, Gale B, Benito P, Kelley DS, Nelson GJ. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids* 35: 777–782.

Zandstra EH, de Graaf C, van Trijp HCM, van Staveren WA. 1999. Laboratory hedonic ratings as predictors of consumption. *Food Quality and Preference* 10: 411–418.

Zarrati M, Shidfar F, Nourijelyani K, Mofid V, Hossein MJ, Bidad K. 2013. *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium* BB12, and *Lactobacillus casei* DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells of obese and overweight people. *Biofactors* 39: 633–643.

Zaslloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh J. 2005. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310: 996–999.

Zhang J, Kang MJ, Kim MJ, Kim ME, Song JH, Lee YM, Kim JY. 2008. Pancreatic lipase inhibitory activity of taraxacum officinale *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Research and Practice* 2(4): 200-203.

Zheng J, Greenway FL. 2012. *Caenorhabditis elegans* as a model for obesity research. *International Journal of Obesity* 36(2): 186-194.

Zhu Y, Hsu WH, Hollis, JH. 2013. The impact of food viscosity on eating rate, subjective appetite, glycemic response and gastric emptying rate. *PLoS One* 8(6): e67482.

Zhu Z, Qiu N, Yi J. 2010. Production and characterization of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernel protein hydrolysate. *European Food Research and Technology* 231: 13-19.

Zomer E, Owen A, Magliano DJ, Liew D, Reid CM. 2012. The effectiveness and cost effectiveness of dark chocolate consumption as prevention therapy in people at high risk of cardiovascular disease: best case scenario analysis using a Markov model. *British Medical Journal (BMJ)* 344:e3657.