



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Efecto del Horario de la Ingesta de Chocolate  
sobre la Distribución de la Grasa Corporal,  
la Oxidación del Sustrato y la Microbiota.  
Estudio Aleatorio y Cruzado**

**Dña. M<sup>a</sup> Teresa Hernández González  
2022**





Memoria presentada por  
**TERESA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ**  
para optar al GRADO DE DOCTOR por la  
**Universidad de Murcia, 2022**

Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por:

**Dra. MARTA GARAULET AZA.**

Catedrática de Fisiología.

Departamento de Fisiología.

Universidad de Murcia, España.



*A mis padres,  
con admiración y agradecimiento por su ejemplo y su cariño.*



# AGRADECIMIENTOS

---





Desde que acabé la carrera de Farmacia he querido realizar mi tesis doctoral. Circunstancias familiares y profesionales se fueron interponiendo y, aunque nunca perdí la ilusión, lo consideraba un sueño inalcanzable.

Llegado este momento siento una profunda alegría por haberlo conseguido y por lo que han supuesto para mí estos cinco años de trabajo. Ha sido mucho lo que he aprendido, y lo que me han aportado todas las personas que me han ayudado o alentado en este camino. Es por ello, que aun teniendo gran interés por agradecerse a todas, sienta ya de antemano que las palabras se me quedan cortas.

El primer agradecimiento es para mi directora de Tesis, la Catedrática de Fisiología de la Universidad de Murcia, D<sup>a</sup>. **Marta Garaulet Aza**, por haberme brindado esta oportunidad. Muchas gracias Marta por tu exigencia, por tu paciencia, por tu pasión por la ciencia y por el trabajo bien hecho. Y gracias también por tu amistad y tu cariño. Lo que empezó con una conversación telefónica, se ha convertido en una amistad de más de 20 años. Te agradezco mucho cómo me has ayudado a mejorar y que me hayas “empujado” siempre para que no me parase o acomodase.

Comenzamos este proyecto pensando que era el mejor momento. En el camino surgió un cambio profesional importante, una situación personal difícil, y hasta una pandemia..... A pesar de todo, lo hemos logrado.

La primera impresión que tuve al conocer al equipo de investigación fue que éramos muy distintos, no ya solo por edad, que también, sino además por circunstancias personales, familiares y profesionales. Estas diferencias no han hecho más que aportarme y contribuir a que a día de hoy no sea la misma que empezó la tesis. He de agradecer a todos su acogida, compañerismo y simpatía. El hecho de hacerme sentir parte de un GRUPO, desde el primer día y en todo momento, tiene mucho que ver con la calidad de las personas que lo componen y con su líder ¡Muchas gracias!

En este equipo he tenido la suerte de descubrir a **Nuria** Martínez Lozano. No olvidaré la generosidad y disponibilidad que ha derrochado conmigo, ni tampoco su gesto sereno y dulce.

De **Puri** Gómez Abellán podría decir muchas cosas, pero hay una cualidad que pienso la define muy bien, y es su gran “corazón de madre” en el que cabe todo el equipo ..... Muchas gracias Puri por acogerme en él a mí también.

Agradezco a **Jesús** López Mínguez, otro descubrimiento, su cercanía, sus conocimientos y esa risa que le caracteriza y que es capaz de contagiar. Junto a “nuestra espectacular” **Vero** me han hecho sentir cómoda y en confianza.

A **Carol**, discreta, hormiguita y siempre disponible para ayudar. A **Jazmin**, que es una “crack” y en un segundo es capaz de resolver lo más difícil. A **Laura**, por su cariño y por esas conversaciones tan interesantes sobre algo que nos une, la lectura. Y a las incorporaciones más recientes pero geniales, **Verónica** y **Teresa**, dispuestas a ayudar en cualquier momento

Un agradecimiento especial a todos los que han formado parte de este grupo de investigación. A **Patricia**, por su ayuda que fue fundamental al inicio de este trabajo. A **Gema**, con la que empecé a desenvolverme en el laboratorio. A **Beatriz, Mari Paz y Cristina**, mujeres brillantes cada una en su estilo. A **Álvaro y Uriel**. Soy muy afortunada por haber podido trabajar con todos ellos.

Y a **Gabriel** Albasini Garaulet por lo mucho que me ayudó con las figuras.

Quisiera agradecer al Catedrático de Fisiología de la Universidad de Murcia, D. **Juan Antonio Madrid**, por ser una persona accesible y generosa, que explica la cronobiología como si fuera fácil.

A la profesora **Rocío González Barrio** por introducirme en el mundo de la microbiota y brindarme su confianza desde el primer día, ha sido un placer trabajar con ella. A **Mª Jesús Periago** porque sus certeras consideraciones han sido cruciales para el desarrollo de este trabajo. Y a **Mª Carmen Collado** por su aportación en el análisis de la microbiota que ha mejorado notablemente los resultados de esta tesis.

Gracias también a cada una de las **voluntarias** que han participado en este trabajo, sin ellas no hubiera sido posible esta investigación. Su compromiso y simpatía me han facilitado todo.

Y mi agradecimiento a las personas que aunque no han participado directamente en esta tesis, han contribuido a que salga adelante:

A mi equipo; las personas con las que tengo la suerte de trabajar en el Centro de Nutrición Garaulet de Lorca y en la farmacia que son: **Adela, Jéssica, Paca, Mafhoud, Marimar, Ana, Encarni, Sonia, Lorena y Sofía**. Su dedicación y profesionalidad me ha permitido avanzar y alcanzar mi sueño.

A mis **AMIGAS**, las de siempre y las más recientes. Todas ellas son piezas clave en mi vida. Sin su cariño y amistad no sería la misma.

Y a las personas que más quiero, “mi familia”:

A mi **padre**, en el que no puedo pensar sin emocionarme. Su amor al trabajo y a la familia, su sencillez y el cariño con el que nos ha tratado hacen que quiera parecerme más a él cada día. A mi **madre**, mi referente, por su bondad sin límite y su amor incondicional. A mis hermanos, **Sebastián y Pepe**, por ser una continuación de mis padres y protegerme siempre. A mis cuñadas, **Belén y Dolo**, porque tengo la suerte de tenerlas. A todos mis **sobrinos** por su cariño constante, y en particular a **Belén**, por ser la hija que no tengo.

A la familia con la que me he encontrado, mi “familia política”, por su cariño y cercanía.

A mis hijos, **Rafa, Curro, Pepe, Javi y Gonzalo** por llenar mi vida de alegría y hacerme tan feliz.

Y a **Rafa**, mi marido, porque con él TODO es posible.

Al escribir estos agradecimientos y echar la vista atrás me doy cuenta de lo afortunada que soy. No creo en las casualidades, doy gracias a **Dios** por todo lo anterior.



# ÍNDICE

---



ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....	18
INTRODUCCIÓN .....	1
1. EL CHOCOLATE .....	3
1.1 Definición de chocolate.....	3
1.2 Frecuencia de consumo de chocolate.....	3
1.3 Orígenes e introducción en Europa.....	5
2. ASPECTOS NUTRICIONALES DEL CHOCOLATE .....	6
2.1 Composición nutricional del chocolate.....	6
2.2 Los antioxidantes del chocolate.....	10
2.3 Cafeína y teobromina en el chocolate.....	12
3. RELACIÓN ENTRE EL CHOCOLATE Y EL PESO CORPORAL .....	13
3.1 Obesidad.....	13
3.2 Ingesta energética.....	15
3.3 Gasto energético.....	15
3.4 Chocolate y peso corporal.....	17
4. RELACIÓN ENTRE CHOCOLATE Y GLUCEMIA.....	19
5. LA IMPORTANCIA DEL “CUÁNDO” COMEMOS.....	22
5.1 Los ritmos circadianos.....	24
5.2 Cronotipo y técnicas de evaluación.....	27
5.3 La cronodisrupción.....	33
6. MENOPAUSIA .....	34
6.1 Menopausia y cronobiología.....	36
7. MICROBIOTA .....	37
OBJETIVOS.....	41
1. Estado actual e hipótesis de partida.....	43
2. Objetivos específicos.....	44
MATERIAL Y MÉTODOS .....	45
1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO .....	47
1.1 Reclutamiento y adhesión al experimento.....	49
2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	50
3. MEDIDAS GENERALES.....	52
3.1 Antropometría.....	52
3.2 Determinación del porcentaje de grasa corporal.....	53

3.3 Ingesta dietética (cantidad y horario) .....	54
3.4 Hambre y apetito por dulce .....	57
3.5 Calidad y duración del sueño, y frecuencia de la siesta .....	59
3.6 Temperatura periférica y actimetría .....	59
3.7 Variable integradora TAP (Temperatura, Actividad y Posición) y sueño .....	60
3.7 Calorimetría indirecta .....	61
3.8 Determinación de cortisol y melatonina salival .....	62
3.9 Glucemia basal y postprandial .....	63
3.10 Microbiota .....	64
4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS .....	69
4.1 Análisis comparativo entre las tres condiciones del estudio .....	69
4.2 Microbiota .....	69
4.3 Poder estadístico .....	70
5. BÚQUEDA BIBLIOGRÁFICA .....	70
RESULTADOS .....	73
1. Resultados objetivo 1 .....	75
2. Resultados objetivo 2 .....	79
3. Resultados objetivo 3 .....	93
4. Resultados objetivo 4 .....	97
5. Resultados objetivo 5 .....	103
DISCUSIÓN .....	115
1. Sobre el efecto de la ingesta de chocolate en el peso corporal y en la circunferencia de cintura .....	117
2. Sobre el posible papel de la ingesta y el gasto energético en la ausencia de aumento de peso tras la ingesta de chocolate .....	126
2.1 En relación a la ingesta energética .....	126
2.2 En relación al gasto de energía .....	130
2.3 Cambios en el sueño y en variables circadianas .....	132
3. Efectos metabólicos inducidos por el consumo de chocolate .....	137
3.1 Sobre la oxidación del sustrato .....	138
4. Sobre el efecto de la ingesta de chocolate sobre la glucemia .....	142
5. Sobre los cambios en la composición y función de la microbiota intestinal .....	146
5.1 Función de la microbiota .....	148
5.2 Asociación entre composición y función de la microbiota .....	150
CONCLUSIONES .....	155



Recomendación final.....	158
BIBLIOGRAFÍA.....	159
ANEXOS .....	177
CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA .....	207

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AGCC</b>	Ácidos Grasos de Cadena Corta
<b>CM</b>	Chocolate Mañana
<b>CE</b>	Chocolate Noche
<b>N</b>	Sin chocolate (Control)
<b>CD</b>	Cronodisrupción
<b>CR</b>	Cociente Respiratorio
<b>DLMO</b>	Inicio de la subida de melatonina con luz tenue
<b>DS</b>	Desviación estándar
<b>HOMA-IR</b>	Índice de resistencia a la insulina
<b>ICC</b>	Índice Cintura Cadera
<b>IMC</b>	Índice de Masa Corporal
<b>IPAQ</b>	Cuestionario internacional de actividad física
<b>MB</b>	Metabolismo Basal
<b>VO<sub>2</sub></b>	Oxígeno consumido
<b>VCO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono liberado
<b>MCTQ</b>	Cuestionario de Munich
<b>MEQ</b>	Cuestionario matutino vespertino
<b>VAS</b>	Test analógico de escala visual
<b>SCN</b>	Núcleo supraquiasmático
<b>SEEDO</b>	Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
<b>TAP</b>	Temperatura, Actividad y Posición
<b>ACP</b>	Análisis de Componentes Principales

## GLOSARIO

**Acrofase:** Período de tiempo durante el cual el ciclo diario de una variable alcanza su punto máximo.

**Amplitud:** diferencia entre el valor máximo (o mínimo) de la función coseno y el mesor.

**Amplitud relativa (RA):** Diferencia entre el promedio de las mediciones hechas durante las 5 horas consecutivas de máximos valores (M5) y la media de las mediciones hechas durante las 10 horas consecutivas con el mínimo valor (L10), dividido entre la suma de ambos valores (M5+L10).

**Contraste día-noche:** diferencia entre el promedio de mediciones durante las 5 horas consecutivas de máximo TAP y el promedio de mediciones realizadas durante las 10 horas consecutivas del mínimo TAP dividido entre la suma de ambos valores.

**Cosinor:** procedimiento para el análisis de ritmos biológicos basado en la adaptación de una onda cosenoidal a los datos brutos.

**Cronobiología:** (“kronos” de tiempo, “bios” de vida y “logos” de estudio) es la ciencia que estudia todos estos fenómenos periódicos o ritmos biológicos que se producen en los seres vivos.

**Cronotipo matutino:** característica del sujeto que encuentra su estado de máximo rendimiento por la mañana.

**Cronotipo vespertino:** característica del sujeto que encuentra su estado de máximo rendimiento por la noche.

**Cuestionario de Munich (MCTQ):** consta de 17 preguntas simples sobre el comportamiento del ciclo sueño y vigilia. Estas preguntas abordan la hora de acostarse, y la hora de levantarse por separado para días laborables y días libres. Utiliza los centros del sueño para la clasificación del sujeto.

**Cuestionario matutino-vespertino (MEQ):** consta de una escala de 19 ítems desarrollado por Horne y Östberg, con la que se obtiene una puntuación que clasifica al sujeto en matutino, indefinido o vespertino.

**Estabilidad interdiaria (IS):** regularidad del ritmo. Sus valores oscilan entre 0 y 1. Cuanto más se acerque al valor 1 el ritmo presenta una mejor estabilidad, es decir, se repite exactamente día tras día.

**Fase del ritmo o acrofase:** hora en el que ritmo alcanza su máximo valor.

**Hábitos regulares:** derivado de la estabilidad interdiaria (IS), determina la constancia del patrón rítmico de 24 horas durante los 7 días. Un ritmo estable se caracteriza por un perfil de 24 horas muy similar día a día.

**HOMA-IR:** representa las siglas en inglés del modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina ("homeostatic model assessment").

**Índice de funcionalidad circadiana (CFI):** índice numérico que determina la robustez circadiana basado en tres parámetros circadianos: estabilidad interdiaria, variabilidad intradiaria y la amplitud relativa. CFI se calculó como el promedio de estos tres parámetros. En consecuencia, CFI oscila entre 0 (ausencia de ritmicidad circadiana) y 1 (ritmo circadiano robusto).

**Jet lag social:** síndrome que ocurre cuando el reloj biológico de nuestro cuerpo y nuestros horarios sociales no coinciden. Se refiere a la diferencia entre el centro del sueño de los días no laborables y los laborables. Cuando esta diferencia es mayor a 2 horas se considera que existe jet lag social.

**L10:** promedio de las diez horas consecutivas de valores mínimos del ritmo de temperatura y su hora TL10.

**TL5:** promedio de las cinco horas consecutivas de valores mínimos del ritmo de actividad y posición y su hora TL5.

**M10:** promedio de las diez horas consecutivas de valores máximos del ritmo de actividad y posición y su hora TM10.

**M5:** promedio de las cinco horas consecutivas de valores máximos del ritmo de temperatura y su hora TM5.

**Mesor:** valor medio del ritmo ajustado a una función coseno que por lo general coincide con la media.

**Núcleo supraquiasmático (NSQ):** también llamado reloj central, está formado por un conjunto de neuronas situadas en el hipotálamo, y se encarga de regular los ciclos circadianos y el control de la secreción de melatonina. Es el principal reloj biológico interno o marcapasos en los mamíferos.

**Rayleigh:** evalúa la distribución de la acrofase dentro de un período de 24 horas. Esta prueba proporciona un vector  $r$  con su origen en el centro de una circunferencia de radio igual a uno. La longitud del vector  $r$  (entre 0 y 1) es proporcional al grado de homogeneidad de fase durante el período analizado y puede considerarse como una medida de la estabilidad de fase del ritmo durante los 7 días sucesivos.

**Ritmos circadianos:** procesos que ocurren o funcionan en ciclos de aproximadamente 24 horas.

**Sincronizador:** estímulo capaz de restablecer un marcapasos o sincronizar una oscilación con el medio ambiente.

**TM5:** Hora media de las cinco horas de máximo valor de un ritmo. Se utiliza como marcador de fase para el ritmo de temperatura.

**TM10:** hora media de las diez horas de mínimo valor de un ritmo. Se utiliza como marcador de fase para el ritmo de actividad.

**Variabilidad intradiaria (IV):** fragmentación del ritmo. Sus valores oscilan entre 0 y 2. Cuanto más se acerque al valor 0 la onda es perfectamente sinusoidal y el ritmo es menos fragmentado.



# INTRODUCCIÓN

---





## 1. EL CHOCOLATE

### 1.1 Definición de chocolate

El árbol del cacao proporciona uno de los productos alimenticios más populares en el mundo, el chocolate (1). Mientras el término cacao se refiere al producto natural, el chocolate es un alimento procesado derivado del cacao (2).

El chocolate, tal y como lo conocemos en la actualidad, es un producto elaborado a partir del fruto del árbol de cacao, que crece en América Central y del Sur, y en África occidental (3). Su cultivo tiene lugar en el conocido como “cinturón del chocolate”, zona que se extiende entre 10 y 20 grados de latitud, de norte a sur del Ecuador (4).

El fruto del árbol del cacao se llama vaina o carbósido. De cada uno de estos frutos se obtienen entre 20 y 50 semillas o granos de cacao que tras un proceso de fermentación, secado y tueste, dan lugar a los principales componentes del cacao y del chocolate (4).

Entre los siglos XIX y XX el chocolate sufrió una importante evolución ya que pasó de ser una bebida, a presentarse en forma sólida y en sus variedades consideradas más placenteras, como son el chocolate con leche, el chocolate blanco y el chocolate negro o también denominado fondant, entre otros (4).

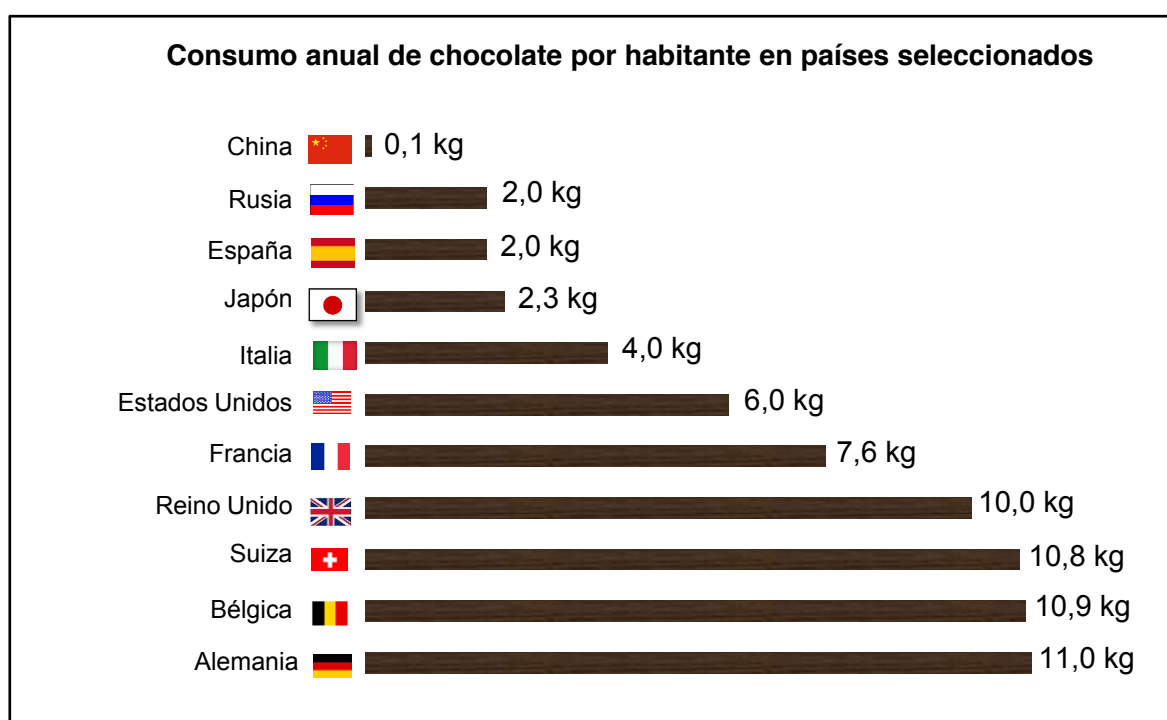
### 1.2 Frecuencia de consumo de chocolate

Tanto el cacao como el chocolate preparado con granos de cacao, tienen una larga reputación como alimentos saludables (5). Tanto los beneficios para la salud, como la sensación de placer que se asocia a su consumo, han convertido al chocolate en un alimento muy apreciado en todo el mundo aunque su consumo varía de unos países a otros.

Un estudio realizado por Seligson *et al.* (6) sobre los patrones de consumo de chocolate en el mundo puso de manifiesto que el consumo en Estados Unidos era moderado (4,6-4,8 kg por persona y año) comparado con algunos países del norte de Europa en los que el consumo alcanzaba 7-10 kg

por persona y año. El 11% de la población de Estados Unidos mostró un consumo de chocolate de al menos 1 de los 3 días registrados en la encuesta de alimentos (6). En general el consumo de chocolate es mayor en invierno que en otras estaciones del año y se consume preferiblemente como “snack” entre comidas (6).

En el año 2016 el Sindicato de Chocolate en Francia (Sydicat du Chocolat), organismo que reúne a 60 empresas que producen y comercializan chocolate, llevó a cabo un estudio para responder a la pregunta sobre cuánto chocolate se toma en todo el mundo. Los resultados se representan en la **Figura 1**, que muestra como los alemanes son grandes aficionados al chocolate y consumen el equivalente a 11 kilos de chocolate por persona y año, le siguen muy de cerca los belgas (10,9 kg) y los suizos (10,8 kg), habitantes de países conocidos por sus exquisitos chocolates. El consumo en España es del orden de cinco veces inferior, y se estima en 2 kg por persona y año (Figura 1).



**Figura 1.** Gráfico adaptado de Statista que muestra el consumo de chocolate por habitante en países seleccionados (<https://es.statista.com/grafico/6525/que-paises-consumen-mas-chocolate/>).

Aunque el cacao se consume desde el año 460 a. C. no se comenzó a utilizar en pastelería hasta el siglo XIX cuando se inventó la prensa de cacao (6). Durante siglos se había consumido en forma de bebida, y fue a partir del año 1828 cuando se empiezan a elaborar dulces de chocolate. En la actualidad, el cacao se consume también en mezclas de café instantáneo, coberturas, galletas, bebidas alimenticias, helados y cereales, por lo que su consumo es muy frecuente.

### 1.3 Orígenes e introducción en Europa

Los orígenes del chocolate se remontan al año 440 a. C. en Sudamérica, concretamente en México, en la época Maya (7). Probablemente fue este pueblo el primero en cultivar cacao. Los mayas preparaban, añadiéndole agua caliente, una bebida amarga, de fuerte sabor, y de gran valor energético a la que llamaron «Alimento de Dioses» (*Teobroma Cacao*) (7).

La historia atribuye a Hernán Cortés haber sido el primer europeo en reconocer el enorme potencial económico del cacao. Sin embargo, parece ser que fue Cristóbal Colón el primer europeo que tuvo contacto con el cacao. Se ha descrito que en el año 1502, durante su cuarto viaje a América, Colón capturó una canoa que contenía granos de cacao (8). Estos granos eran considerados "almendras misteriosas" y se utilizaban como una forma de moneda en Mesoamérica (8).

La historia relata que en 1520, el emperador azteca Moctezuma agasajó a Hernán Cortés y a sus soldados con "xocolatl" [es decir, xococ (amargo) y atl (agua)], palabra azteca que significa "agua espumosa". El español comprobó que sus tropas podían soportar todo un día de marcha forzada consumiendo solo un vaso de "xocoatl". Moctezuma regaló al conquistador español la plantación real de cacao de Manialtepec y a partir de ese momento Cortés estableció con los indígenas el intercambio de las avellanas del árbol del cacao por oro (8).

El cacao llegó a Europa en 1528, cuando el conquistador español Hernán Cortés obsequió con muestras de cacao al rey Carlos V de España,

proclamando los grandes efectos de la bebida preparada a partir de este "oro marrón" (8). Años más tarde, en 1544, el chocolate como bebida, fue presentado a la corte española por los nobles mayas de Kekchi, traídos del Nuevo Mundo por los frailes dominicos para encontrarse con Felipe II.

En cuestión de un siglo, los usos culinarios y médicos del chocolate se extendieron a Francia, Inglaterra y otros lugares de Europa occidental. Pero se planteaba una dificultad, y es que el hábitat natural de la planta del cacao es un bosque lluvioso de hoja perenne, con temperaturas altas que alcanzan los 30-31°C, y humedad del 100% durante el día y que desciende al 70 u 80% por la noche. La demanda de esta planta llevó a los franceses a establecer plantaciones de cacao en el Caribe, mientras que España desarrolló sus plantaciones de cacao en Filipinas (8).

En el año 1753, el científico sueco Carl Linnaeus, le puso nombre a la planta de cacao. La llamó *Theobroma Cacao*, del nombre latino *Theobroma* [literalmente 'alimento de los dioses'], mientras que la palabra chocolate procede del azteca "xocolatl" [es decir, xococ (amargo) y atl (agua)] (7).

Entre los europeos, el cacao floreció en la década de 1880, después de su introducción como cultivo comercial en la colonia inglesa Gold Coast en África occidental (8). En 1876, Daniel Peter, elaboró el primer chocolate con leche en Suiza (9).

La historia del chocolate continúa hasta hoy y aunque en la actualidad no se le considera un "alimento de Dioses" continúa teniendo un estatus especial en nuestra sociedad. Es uno de los alimentos más queridos y anhelados y a la vez más temidos por su alto contenido calórico y elevada proporción en grasas y azúcares (10). Tomar chocolate evoca sentimientos agradables y mejora el estado de ánimo (11, 12).

## **2. ASPECTOS NUTRICIONALES DEL CHOCOLATE**

### **2.1 Composición nutricional del chocolate**

En la formulación del chocolate son elementos clave los sólidos de cacao, la manteca de cacao, el azúcar y la lecitina que actúa como emulgente (2).

En la actualidad, las principales categorías comerciales de chocolate son el chocolate puro también llamado chocolate negro o fondant, el con leche y el blanco (2), que difieren en su composición nutricional (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Composición nutricional de los diferentes tipos de chocolate.**

Componente	Chocolate puro	Chocolate leche (*)	Chocolate blanco
Energía total (kcal)	543	538	547
Proteína total (g)	4,7	9,19	8
Carbohidratos (g)	64,8	54,1	58,8
Fibra, dietética total (g)	-	0,8	0,8
Lípidos, totales (g)	29,2	31,5	30,9
AG, monoinsaturados totales (g)	9,3	10,23	9,9
AG, poliinsaturados totales (g)	1,2	1,09	1,1
AG, saturados totales (g)	16,9	18,96	18,2
Agua (g)	1,3	2,9	1,5
Colesterol (mg)	9	28	23
Vitamina A (µg)	8,67	33,16	26
Vitamina D (µg)	0	0	traza
Vitamina E (mg)	0,13	0,7	1,14
Folatos (µg)	0	10	10
Equivalentes de Niacina (mg)	0,97	2,22	5,4
Riboflavina (mg)	0,14	0,37	0,49
Tiamina (mg)	0,05	0,11	0,08
Vitamina B12 (µg)	0	traza	traza
Vitamina B6 (mg)	0,05	0,11	0,07
Vitamina C (mg)	0	traza	0
Calcio (mg)	37,67	247	270
Hierro (mg)	1,5	1,7	0,2
Potasio (mg)	359,67	465	350
Magnesio (mg)	123,67	71	26
Sodio (mg)	12,33	58	110
Fósforo (mg)	181,33	261	230
Iodo (µg)	2,3	5,5	6
Selenio (µg)	6,8	3	3
Zinc (mg)	2,23	1,7	0,9

Información procedente de la Base de datos Española De Composición de Alimentos (BEDCA). La composición nutricional corresponde a 100 g de producto comestible.

(\*) El chocolate utilizado en nuestro trabajo, difiere ligeramente de la composición del chocolate con leche que se muestra esta tabla (ver en Material y Métodos).

El contenido energético de los diferentes tipos de chocolate es elevado, superior a 3000 kcal por kg de producto. El chocolate (100 g) aporta aproximadamente el 25% de la ingesta de energía diaria de un adulto promedio (2000 kcal/día). Esta elevada densidad calórica corresponde a su alto contenido en carbohidratos, que son en su mayoría azúcares y representan hasta el 60% del total de la energía de este alimento, y en grasas que representan un 30% (2). Las grasas se encuentran principalmente en forma de triglicéridos que contienen mayoritariamente ácidos grasos saturados (Tabla 1).

El chocolate tiene además en su composición, aunque en menor cantidad, proteínas, agua, algunos minerales como fósforo, magnesio, hierro y calcio y trazas de otros minerales y vitaminas (Tabla1).

Los valores sobre la composición nutricional de los distintos tipos de chocolate mostrados en la Tabla 1 y obtenidos de la Base de datos Española De Composición de Alimentos (BEDCA, <https://www.bedca.net/bdpub/index.php>) coinciden con los valores aportados por la base de datos de USDA-2010 (<https://www.fns.usda.gov/dietary-guidelines-2010>).

El contenido de cada nutriente en el chocolate depende, entre otros factores, de la cantidad de sólidos de cacao. Cuando el contenido relativo de sólidos de cacao en el chocolate aumenta respecto a los demás componentes, el porcentaje de carbohidratos disminuye, mientras que se produce un aumento en el contenido de grasa total.

En cuanto a su composición química, el chocolate puede ser considerado como una suspensión densa de partículas sólidas (azúcar, cacao y mezcla de leche, según el tipo) todo ello disperso en una fase grasa continua, que se compone principalmente de manteca de cacao (13, 14). La manteca de cacao es considerada como el principal subproducto del cacao por sus propiedades físicas (reología y textura), características químicas y propiedades organolépticas (15). Constituye la materia grasa del chocolate y está compuesta por: A) Ácido esteárico (C18:0;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$ ) en una proporción del 35%, Ácido graso cuyo efecto sobre el colesterol es neutro. B) Ácido oleico (C18:1;  $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$ ), que se encuentra en una proporción del 31% y

que tiene efectos hipocolesterolemiantes. C) Ácido palmítico (C16:0;  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ) que se presenta en un 26% y que se ha relacionado con un aumento en las concentraciones de colesterol plasmático (16).

Nutricionalmente, la elevada proporción de ácidos grasos saturados respecto a los insaturados que presenta el chocolate podría disminuir la calidad nutricional del chocolate y es un aspecto negativo desde el punto de vista de la salud. Los ácidos grasos saturados se han relacionado con la incidencia de arterioesclerosis y enfermedad cardiovascular (17). El chocolate debido a su elevado contenido en ácidos grasos saturados se ha postulado como un alimento hipercolesterolemiante. Sin embargo, y debido a los mecanismos de compensación de los ácidos oleico y esteárico sobre el palmítico, diversos ensayos clínicos han demostrado el efecto neutro del chocolate sobre los valores de colesterol en suero (18-20).

Otros autores, tales como Wan *et al.* (2001) (21) han demostrado el efecto beneficioso del chocolate, ya que la concentración de HDL aumentó en un 4% tras un consumo diario de 22 g de cacao en polvo y 16 g de chocolate negro, durante un periodo continuado de cuatro semanas. En esta línea, Mursu *et al.* (2004) (22) demostraron que después de una ingesta diaria de 75 g de chocolate negro durante tres semanas, la concentración de colesterol HDL aumentó entre un 11 y un 14%.

El cacao tiene por naturaleza un característico sabor amargo causado por la presencia de polifenoles y alcaloides. Para evitar que el chocolate sea demasiado amargo se le añade azúcar. La contribución del azúcar en el sabor del chocolate es importante, de hecho un cambio de solo un 5% en la cantidad de azúcar añadida afecta al sabor. Para la elaboración de dulces de chocolate se utiliza principalmente sacarosa mientras que en la fabricación de chocolate con leche se añade lactosa (23) y leche en polvo que contiene la grasa de la leche y aporta suavidad al chocolate (9).

## 2.2 Los antioxidantes del chocolate

El consumo de cacao se ha asociado con beneficios para la salud tales como: aportar mayor fortaleza, vigor sexual, resistencia al trabajo duro y a las bajas temperaturas, y muchos otros, aunque inicialmente sin un fundamento científico probado (8). Sin embargo, el conocimiento actual de los beneficios para la salud aportado por muchas sustancias de origen natural, y los adelantos técnicos, han posicionado a algunos alimentos y otros productos naturales en el rango de «beneficiosos para la salud». El chocolate es considerado uno de ellos debido al poder antioxidante de sus componentes (24).

La función de los antioxidantes de origen natural se relaciona con su acción protectora en la prevención y desarrollo de diversas patologías identificadas como «patologías por estrés oxidativo» (25, 26). De hecho su consumo es actualmente recomendado en todos los rangos de edad, y particularmente en la edad adulta y en la senescencia (27).

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales que protegen al organismo de los daños producidos por agentes oxidantes. Siendo los flavonoles y flavanoles diferentes tipos de flavonoides. Estudios de intervención en humanos han mostrado que los flavonoides, mejoran la salud cardiovascular y moderan la inflamación (24, 28, 29); reducen el riesgo de infartos cerebrales al evitar la formación de coágulos y reducir la presión arterial (30). Además presentan efectos positivos sobre el Alzheimer, al mejorar el flujo sanguíneo en el cerebro (31).

Otros autores tales como Grassy *et al.* (32), mostraron que suplementar la dieta con chocolate negro se asocia con una mejora en la sensibilidad y resistencia a la insulina, y disminución de la presión arterial sistólica, mientras que el chocolate blanco no presenta ningún efecto aparente. Este estudio, que se realizó en 15 jóvenes sanos cuyas dietas se complementaban diariamente con 100 g de chocolate negro o 90 g de chocolate blanco, atribuyó el efecto beneficioso del chocolate negro a la abundancia de polifenoles presentes en el chocolate negro y a la escasez en el blanco (32).



**Tabla 2. Contenido en polifenoles de los tres tipos de chocolate.** (www.phenol-explorer.eu/)

Componente	Chocolate puro	Chocolate leche	Chocolate blanco
<b>Polifenoles totales</b> (mg/100g)	1859,88	854,34	-
<b>Flavanoles</b>			
Catequina (mg/100 g)	20,5	4,64	-
Epicatequina (mg/100 g)	70,36	14,58	-
Cinnamtanina A2 (mg/100 g)	53,83	-	-
Procianidina dímero B2 (mg/100g)	36,5	-	-
<b>Flavonoles</b>			
Quercetina (mg/100 g)	25	-	-

Entre los antioxidantes que se consumen de forma natural, los flavonoides ocupan un lugar relevante (33, 34). Siendo el cacao uno de los alimentos que tiene una elevada proporción de los mismos (35). Un estudio comparativo entre el polvo de cacao y el polvo de fruta demostró que las semillas de cacao contienen mayor cantidad de antioxidantes (polifenoles, en especial flavonoides) que cualquier fruta, y en base a los resultados se determinó que las semillas de cacao eran como <<superfrutas>> desde el punto de vista nutritivo (36).

El cacao contiene una elevada concentración de flavonoides, muy por encima de los encontrados en otros alimentos ricos en ellos tales como los arándanos y la granada (**Tabla 3**). Específicamente, la concentración de flavanoles en el polvo de cacao tales como epicatequina es >2 mg/g, catequina >0,5 mg/g y procianidina >20 mg/g (37).

**Tabla 3. Diferencias en el contenido en flavonoides entre diferentes alimentos.**

Alimento	Contenido en Flavanoles (mg/g)
Polvo de Arándanos	9,5
Polvo de Granada	4
Polvo de Cacao	30

Tabla elaborada con los resultados obtenidos por Crozier *et al.* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21299842>)

Aunque la literatura científica revisada sugiere que el consumo de chocolate puede tener efectos beneficiosos para la salud (38, 39), debe tenerse en cuenta que el chocolate tiene un alto contenido en grasa total y en azúcar. En consecuencia, la creencia es que el consumo diario de grandes cantidades de chocolate puede aumentar el peso corporal del individuo a largo plazo (22). Por ello, se ha propuesto que su consumo debe considerarse en el contexto de una dieta saludable y en cantidades moderadas (20-25 g/día) (40, 41). Sin embargo estas recomendaciones siguen siendo cuestionadas.

### 2.3 Cafeína y teobromina en el chocolate

La cafeína, teofilina y teobromina son metilxantinas, un grupo de alcaloides estimulantes del sistema nervioso central (SNC). Se ha descrito que, en dosis moderadas, estas metilxantinas producen una mejora del rendimiento mental y físico, y reducen el cansancio y el sueño (42).

Actualmente la cafeína, la teofilina y la teobromina son indiscutiblemente los psicoestimulantes más utilizados en todo el mundo. En España, por ejemplo, se estima que aproximadamente un 80% de la población adulta toma a diario café o té (42). Otros compuestos como el chocolate y bebidas refrescantes como Coca-cola y Nestea (con menor contenido en xantinas) son también ampliamente consumidos por la población más joven. Las xantinas, en una u otra forma, se han utilizado desde la antigüedad, de ahí sus nombres: teofilina (hoja divina) y teobromina (alimento de los dioses).

La mayor fuente de cafeína se obtiene de las semillas de la planta *Coffea Arabica*, mientras que las hojas de té, de la planta *Thea Sinensis*, contienen cafeína y teofilina. Las semillas de cacao *Theobroma cacao*, además de contener teobromina también contienen cafeína, aunque en menores cantidades que las semillas de la planta del café (véase **Tabla 4**) (42).

**Tabla 4. Contenido en metilxantinas de algunos productos alimenticios (42).**

Fuente	Contenido en cafeína	Contenido en Teobromina	Contenido en teofilina
Café (mg/taza)	80-100	-	-
Café descafeinado (mg/taza)	3	-	-
Té (mg/taza)	28	-	10
Bebida de chocolate (mg/taza)	30	-	-
Bebidas de cola (mg/lata)	30-50	-	-
Chocolate puro (mg/onza)	35	300-400	-
Chocolate con leche (mg/onza)	6	-	-

### 3. RELACIÓN ENTRE EL CHOCOLATE Y EL PESO CORPORAL

#### 3.1 Obesidad

La obesidad es una alteración metabólica multifactorial caracterizada por un exceso de grasa corporal que aumenta la probabilidad de desarrollar enfermedades tales como la cardiovascular, diabetes, y otras alteraciones metabólicas, aumentando por tanto la morbi-mortalidad del individuo (43).

Se definen como sujetos con obesidad aquellos sujetos varones con un porcentaje de grasa corporal superior al 25% (44), y aquellas mujeres que presentan un porcentaje de grasa corporal superior al 33% (44). Cuando no se dispone de la tecnología para determinar la cantidad de grasa corporal, se recurre al Índice de Masa Corporal (IMC) como un indicador de peso saludable (45). Dependiendo del rango en el que nos encontremos así tendremos un peso saludable o por el contrario presentaremos sobrepeso u obesidad (**Tabla 5**).

**Tabla 5. Criterios de la SEEDO para definir la obesidad según el IMC (45).**

Valores límites del IMC (kg/m <sup>2</sup> )	
Peso insuficiente	<18,5
Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso grado 1	25-26,9
Sobrepeso grado 2	27-29,9
Obesidad grado 1	30-34,9
Obesidad grado 2	35-39,9
Obesidad grado 3 (mórbida)	40-49,9
Obesidad grado 4 (extrema)	≥50

La distribución de la grasa corporal es otro factor relevante a tener en cuenta en la etiopatogenia de la obesidad. Los individuos que acumulan grasa corporal preferentemente en la región visceral presentan mayor riesgo de sufrir patologías relacionadas con la obesidad (46). Por ello, la determinación del perímetro de cintura, junto con el peso y el porcentaje de grasa corporal, es relevante para el diagnóstico clínico.

**Tabla 6. Datos antropométricos para la distribución de la grasa corporal (46).**

Medida	Límite superior a la normalidad	
	Hombres	Mujeres
Circunferencia de cintura (cm)	102	88

En la obesidad y el sobrepeso se produce un desequilibrio en el balance energético consecuencia de una ingesta calórica superior al gasto energético, acumulándose ese exceso en forma de grasa en el tejido adiposo (47). Este principio termodinámico está sujeto a múltiples factores moduladores y a complejos mecanismos de regulación, entre los que figuran factores

hormonales, genéticos, alteraciones fisiológicas, enfermedades, fármacos y factores ambientales (47).

En los últimos 40 años se ha producido un importante aumento en la prevalencia de la obesidad en el mundo, debido fundamentalmente a cambios en factores ambientales relacionados con el estilo de vida, que han llevado a un aumento del consumo calórico y a un descenso en la actividad física. Probablemente todo ello está relacionado con los avances tecnológicos que han modificado nuestra actividad laboral, social y de tiempo de ocio (48, 49).

### **3.2 Ingesta energética**

La comunidad científica ha aceptado que una de las principales causas de obesidad es el exceso de ingesta de energía (50). Aun así, en trabajos realizados en seres humanos se aprecian contradicciones. Algunos de ellos, en los que se ha medido la ingesta, muestran que los individuos con obesidad comen más que los que no presentan exceso de peso (50, 51). Sin embargo, otros estudios epidemiológicos, tanto longitudinales como transversales, indican que la prevalencia de obesidad aumenta en los diferentes países a pesar de que la ingesta energética disminuye (52). Esta posible contradicción, se podría explicar por los cambios producidos en los alimentos en la sociedad actual, ya que se consumen cada vez alimentos más refinados y con menor contenido en fibra.

Otro factor que podría estar contribuyendo a esta contradicción, es que las técnicas empleadas para la valoración de la ingesta energética son en general técnicas subjetivas. Es el caso de los cuestionarios de registro de alimentos de diferentes días de duración (24h, 7 días). Es por ello que se recomienda el uso de fotografías, para validar la ingesta del sujeto.

### **3.3 Gasto energético**

El gasto energético total comprende tres componentes; los requerimientos de energía de nuestro organismo en reposo, conocido como Metabolismo Basal (MB), que supone entre el 60 y 70% del gasto de energía total, aunque varía

entre individuos dependiendo del porcentaje de masa magra corporal. El segundo componente es la actividad física que se considera la suma de la actividad física básica diaria y el ejercicio físico específico, que se refiere a aquel realizado con algún deporte específico. Y por último el efecto dinámico de los alimentos que corresponde a la energía gastada para procesar los alimentos y supone aproximadamente un 10% de las calorías ingeridas (53).

La medición del gasto energético es el método más preciso para determinar las necesidades de energía de un individuo. Con frecuencia se realiza mediante calorimetría indirecta midiendo el oxígeno consumido ( $VO_2$ ) y el dióxido de carbono liberado ( $VCO_2$ ) en condiciones de reposo del individuo (54).

La energía que precisamos para satisfacer sus requerimientos, procede de la energía química que se libera de los nutrientes a través de la oxidación de sustratos alimenticios. El Cociente Respiratorio (CR) se define como la relación entre  $VCO_2$  y  $VO_2$  y refleja el sustrato usado. La completa oxidación de glucosa produce un valor de CR de 1,0, mientras que la oxidación de lípidos produce un valor CR próximo a 0,7 (54).

**Tabla 7. Tabla comparativa de  $VO_2$ ,  $VCO_2$  y CR durante la oxidación de tres sustratos biológicos (54).** ( $VO_2$ : oxígeno consumido;  $VCO_2$ : dióxido de carbono liberado y CR: cociente respiratorio).

Sustrato	Oxígeno consumido (ml/min)	Dióxido de Carbono liberado (ml/min)	Cociente respiratorio (ml/min)
Glucosa	0,746	0,746	1
Lípidos	2,029	1,43	0,69
Proteínas	0,966	0,782	0,81

Durante el ejercicio físico los lípidos constituyen el sustrato principal responsable del suministro de energía (<65% $VO_2$ max) (55-57). Sin embargo, a medida que aumenta la intensidad del ejercicio aumenta la contribución de la oxidación de carbohidratos y disminuye proporcionalmente la oxidación de lípidos (58). De hecho, el ejercicio físico intenso, que excede al 65%  $VO_2$ max, oxida carbohidratos en mayor proporción (56, 58, 59).

Por otra parte, en un estudio prospectivo llevado a cabo por Froidevaux *et al.* (60) se ha demostrado que los individuos que responden bien a un programa de pérdida de peso y logran mantener la pérdida en el tiempo, presentan una mayor oxidación de lípidos durante el tratamiento.

Para la evaluación de la actividad física, el instrumento más utilizado es el cuestionario internacional de actividad física (IPAQ: International Physical Activity Questionnaire) (61, 62), que ha sido implementado desde el año 2000. Existen dos versiones del IPAQ según el número de preguntas: una versión corta que consta de 9 ítems y otra versión larga que incluye 31 ítems. La versión corta proporciona información sobre el tiempo empleado al caminar en actividades de intensidad moderada y vigorosa, y en actividades sedentarias. La versión larga registra información detallada en actividades de mantenimiento del hogar y jardinería, actividades ocupacionales, transporte, tiempo libre y también actividades sedentarias, lo que facilita calcular el consumo calórico en cada uno de los contextos. La versión corta es la más utilizada en estudios poblacionales (61, 63) aunque en estudios detallados es más interesante el uso del cuestionario largo por su precisión y mayor información.

### **3.4 Chocolate y peso corporal**

El chocolate con leche, debido a su composición nutricional rica en energía, azúcares y grasas, se considera un alimento obesogénico (véase Tabla 1).

Así análisis prospectivos, como el llevado a cabo por Greemberg *et al.* en 2015 (64), en el que participaron 107.243 mujeres postmenopáusicas, muestran que el hábito de tomar chocolate está asociado con un aumento de peso a largo plazo (64). Previamente, en el año 2013, Greemberg y Buijsse (65) habían demostrado que el aumento de peso inducido por el hábito de tomar chocolate se producía de manera dependiente de la dosis consumida. De hecho, los resultados de este estudio mostraron que el peso aumentaba según aumentaba la frecuencia en el consumo de chocolate. Aquellos que tomaban chocolate con una frecuencia de 1 a 4 veces al mes, junto con los que

lo tomaban todas las semanas, experimentaron un aumento en su IMC de 0,26 kg/m<sup>2</sup> y 0,39 kg/m<sup>2</sup> respectivamente (65).

Este aumento de peso coincide con el alto contenido calórico del chocolate y con la disminución de la saciedad inducida por la ingesta habitual del mismo, como se observó en un ensayo controlado aleatorio realizado en 118 mujeres por Tey *et al.* en el año 2012 (66). Los resultados de los análisis prospectivos mencionados demostraron además que la ganancia de peso aumentaba según se incrementaba el IMC y fue mayor para las mujeres obesas (64).

Pero los estudios más relevantes sobre chocolate y su efecto sobre el peso corporal son los estudios de intervención, ya que en ellos se puede deducir la direccionalidad causa-efecto, es decir, si el consumo de chocolate es causa de obesidad o si por el contrario las personas con obesidad presentan una mayor ingesta de chocolate. En este sentido González-Sarrias *et al.* publicaron un meta-análisis en el año 2017 (67), en el que se sugería que el consumo en la dieta de sustancias que contienen flavanol, como es el caso del chocolate, podría reducir el IMC y la circunferencia de cintura (67, 68).

Es interesante que en otro meta-análisis reciente de varios ensayos clínicos, realizado por Kord-Varkaneh *et al.* (69) y publicado en el año 2018, se ha mostrado que la suplementación de chocolate durante varias semanas (de 2 a 24 semanas dependiendo del ensayo) no producía aumento del peso corporal, ni de la circunferencia de cintura.

Este meta-análisis, se hizo tras una revisión sistemática de 35 artículos publicados entre los años 2003 y 2017. Todos ellos se habían realizado en adultos y en los individuos se estudiaban en dos condiciones, con consumo y sin consumo de chocolate. Todos los estudios presentaban suficiente información sobre peso, IMC y circunferencia de cintura, y en todos ellos el diseño fue aleatorio y cruzado. El tamaño de la muestra de los estudios incluidos oscilaba entre 20 y 90 participantes, alcanzando entre los 35 artículos un tamaño de muestra de n=1775.

En esta revisión, se incluyó un análisis secundario de un subgrupo de participantes en el que se mostró que suplementar la dieta con 30 g de



cacao/día durante 4-8 semanas, daba lugar a una reducción del peso y como consecuencia del IMC (69). La duración de la ingesta de chocolate influyó en los resultados, los ensayos con una duración corta ( $\leq 4$  semanas) (70, 71) dieron lugar a un aumento significativo del IMC en las voluntarias, mientras que los ensayos de duración mayor ( $> 8$  semanas) (72, 73) dieron lugar a una reducción del peso corporal.

La cantidad de chocolate consumido también influyó sobre los resultados, en especial sobre la circunferencia de cintura, siendo este efecto no lineal, de hecho se observó una reducción mayor tras la ingesta de 40-60 g de chocolate al día que con cantidades inferiores (69). De esta forma, se demostró que el consumo de una cantidad elevada de chocolate o suplementos de cacao podía no afectar al peso corporal, al diámetro de cintura y al IMC.

En un estudio anterior realizado en animales se mostró que la dosis necesaria para generar un efecto positivo en la reducción de la obesidad, equivalía a una cantidad diaria en humanos de 54 g de cacao en polvo (74). Los resultados del meta-análisis mencionado muestran que la suplementación con  $< 30$ g/día de chocolate durante al menos cuatro semanas tiene resultados favorables sobre el IMC y el peso corporal, produciendo su disminución (69, 72). Lo cual es muy interesante ya que el consumo de dosis elevadas de chocolate al día supone un aumento calórico destacable en la dieta. No debemos olvidar que 100 g chocolate/día aporta del 20 o 30% de la energía diaria de la dieta para un individuo, consideración que habría que tenerse en cuenta en el caso de recomendar un consumo de chocolate a dosis más altas y a largo plazo, y sugiere la conveniencia de realizar nuevos ensayos (69).

#### **4. RELACIÓN ENTRE CHOCOLATE Y GLUCEMIA**

El estudio de la relación entre el chocolate y la glucemia es un tema de interés en ciencia, ya que existen datos contradictorios (75).

La recomendación del chocolate para las personas con diabetes, especialmente para los diabéticos tipo II, presenta una serie de desafíos tanto desde el punto de vista clínico como sociológico, y es que parece contradictorio

que un alimento con un alto contenido en energía y azúcar pueda ofrecer un efecto beneficioso frente a la diabetes (75).

Sin embargo, los beneficios del cacao y del chocolate, tanto para la regulación de la glucosa como para la mejora de las complicaciones asociadas con la diabetes, han sido avalados gracias a estudios mecanicistas y de modelos animales. Cesar Fraga (76) en el año 2005 planteó por primera vez la posibilidad de que el chocolate presentara una acción beneficiosa para las personas con diabetes. Así mismo, en el año 2013, un estudio realizado por Grassi *et al.* (77) reforzó aún más este efecto beneficioso del chocolate sobre la hipertensión y sobre la mejora en la sensibilidad a la insulina. Sin embargo, y a pesar de los resultados de ambos estudios, el efecto beneficioso del chocolate sobre la glucemia sigue sorprendiendo y en general no es aceptado por la comunidad médica.

Con el objetivo de resolver este debate se realizaron varias revisiones sistemáticas y meta-análisis de los resultados de los diferentes ensayos clínicos y estudios epidemiológicos publicados entre los años 2005 y 2015 (78-83). Todas estas revisiones respaldan la teoría de que tanto el cacao como el chocolate tienen efectos positivos sobre la presión arterial y el perfil lipídico, y sobre la resistencia a la insulina, aunque en esta última los resultados son menos evidentes.

Se ha planteado que los polifenoles presentes en el chocolate, podrían ser responsables del efecto beneficioso de este alimento sobre la glucemia por su posible acción sobre la resistencia a la insulina. Así, en el año 2005, Willianson y Manach fueron los primeros en clasificar los efectos beneficiosos de los polifenoles en el chocolate (84) que se representan en la **Tabla 8**.

**Tabla 8. Efectos beneficiosos de los polifenoles presentes en el chocolate (84).**

<b>Reducción de la presión arterial</b>
<b>Mejora del perfil lipídico</b>
<b>Mejora de la salud cardiovascular</b>
<b>Reducción de estrés oxidativo</b>
<b>Reducción de la resistencia a la insulina</b>

Sin embargo, una limitación de estos estudios es que en su mayoría se habían realizado en voluntarios sanos, y son todavía pocos los estudios realizados en personas con diabetes (85-88). En el año 2015 se publicó un trabajo de Mellor *et al.* (75) en el que se revisaron los resultados de un grupo de ensayos clínicos en personas con diabetes sobre el efecto potencialmente beneficioso del cacao y el chocolate (75). En dicho estudio se concluyó que una ingesta demasiado alta de chocolate podría conducir a un balance energético positivo y empeorar el control de la glucemia, mientras que pequeñas cantidades de chocolate rico en polifenoles podrían tener efectos beneficiosos para reducir el riesgo de diabetes (75). Así mismo, la incorporación en la dieta de personas diabéticas de 20 a 45 g de chocolate al día podría generar beneficios dependiendo de su concentración en polifenoles (75).

En la práctica clínica, nos encontramos un problema a la hora de poder recomendar un determinado tipo de chocolate, y es que resulta difícil identificar en los chocolates comerciales la cantidad de polifenoles que presentan. Además, es todavía un desafío comercial producir un chocolate que sea palatable y que presente una dosis suficientemente elevada de polifenoles, y en particular de epicatequinas, debido al fuerte sabor amargo de estos compuestos (75).

Un aspecto relevante es que la mayoría de estos ensayos clínicos han sido realizados con chocolate negro (35-85% de cacao), mientras que el chocolate con leche, con menos contenido en cacao (10-35%), sigue siendo la base de las golosinas y dulces más populares por lo que su consumo es más frecuente y se toma en mayor cantidad. Más importante aún es que ninguno de los estudios ha analizado la hora a la que se toma el chocolate, y esto podría cambiar su efecto sobre la glucemia.

## 5. LA IMPORTANCIA DEL “CUÁNDO” COMEMOS

Durante más de 30 años, la comunidad científica ha estudiado las causas y consecuencias de la obesidad, uno de los principales problemas de Salud Pública del siglo XXI.

Inicialmente, el estudio de estos factores implicados en la obesidad se limitaba al análisis del “qué” comemos, es decir, del consumo de energía y de su reparto en macronutrientes. Posteriormente, se comenzó a considerar la importancia del “cómo” comemos, lo que hace referencia a qué tipo de alimento se consume y qué factores ambientales (tales como los factores emocionales, sociales, etc.) influyen en la selección de unos alimentos u otros, y se comenzó a investigar sobre ello. Durante la última década se ha visto la necesidad de investigar sobre el “cuándo” comemos. Así pues se han realizado diversos estudios sobre el horario de la comida y su relación con el peso corporal. Nuestro grupo de investigación ha jugado un papel relevante en estas investigaciones sobre crononutrición.

La hora a la que comemos se considera un comportamiento modificable que puede influir en la regulación de la energía y, como consecuencia, en el riesgo de obesidad (89, 90). Numerosos estudios en modelos animales (91, 92) y en humanos (93, 94) han demostrado que comer a una hora inadecuada, es decir, en el momento cercano al inicio del sueño, conlleva un aumento de peso y una peor salud metabólica. De hecho, el profesor Fred Turek *et al.* en 2009 (92) demostró, en modelos animales alimentados con una dieta alta en grasas, que ir en contra del reloj biológico interno favorece la obesidad. En este estudio se observó que aquellos ratones que comían sólo durante la fase de luz de 12 horas (período de descanso normal para los roedores, en el que no suelen comer) ganaron significativamente más peso que los ratones alimentados con la misma dieta solo durante la fase oscura de 12 horas (período activo en el que normalmente se produce la ingesta) (92).

En humanos, se ha observado que consumir una mayor cantidad de calorías por la noche se asocia con un riesgo elevado de sobrepeso y obesidad (89, 95), mientras que comer más calorías en el almuerzo o en el desayuno parece ser protector frente al sobrepeso y la obesidad (89, 96, 97). Wang *et al.*

(89) demostraron que las personas que realizaron por la noche una ingesta  $\geq 33\%$  de la energía total del día tuvieron dos veces más probabilidades de ser obesas que aquellas personas que tomaron esta misma ingesta por la mañana. Nuestro grupo ha obtenido resultados semejantes (92).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la distribución de nutrientes en la dieta es diferente según el momento del día. Es el caso de un estudio publicado en 2004 por de Castro (98) cuyos resultados muestran que la comida de la mañana (desayuno) se asocia con una mayor ingesta de carbohidratos y fibra, mientras que en las horas de la tarde (cena), las personas tienen más probabilidades de comer grasas (especialmente alimentos con grasas saturadas). Además, un estudio de intervención sugirió que es más fácil elegir tomar alimentos saludables por la mañana que por la noche, ya que el autocontrol tiende a reducirse a medida que avanza el día (99). Y se ha demostrado también que las personas que no desayunan consumen una elevada ingesta de calorías al día (100).

Ya en el año 2013, nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio longitudinal en 420 personas obesas y con sobrepeso durante una intervención dietética de 20 semanas con el objetivo de comprobar si el horario de la comida era un factor relevante en el control del peso (101). Este estudio fue de los primeros realizados en humanos en mostrar las asociaciones entre la hora de la comida y el efecto metabólico.

Como resultado de este trabajo se demostró que el momento de la comida principal, que en este caso era la comida de medio día ya que se realizó en una población mediterránea, era predictivo del éxito de la pérdida de peso, y que este efecto era independiente de la ingesta calórica total de 24h (101). Este estudio concluyó que aquellas personas que tomaban la comida principal más tarde (después de las 3 del mediodía) perdían significativamente menos peso que aquellas que tomaban la comida principal antes (101). Y todo esto a pesar de que tanto los que comían pronto como los que comían tarde tenían una ingesta calórica similar, semejante actividad física y duración del sueño e incluso no había diferencias en los valores de hormonas relacionadas con el apetito como la ghrelina.

Otro resultado relevante del mismo estudio fue que la sensibilidad a la insulina, valorada por el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR), fue menor entre aquellos que comían tarde en comparación con los que comían temprano (101). En la misma línea, un estudio aleatorio cruzado demostró que el horario de las comidas afecta la tolerancia a la glucosa hacia una menor tolerancia entre aquellos que comen tarde la comida principal del mediodía. En general comer tarde daba lugar a un aumento del riesgo metabólico, incluso en mujeres sanas y normopeso (102).

Otros estudios sobre la efectividad de la pérdida de peso demuestran la importancia de la distribución calórica a lo largo del día. Un experimento de 12 semanas mostró que las personas que tomaban una cantidad importante de calorías durante el desayuno perdían más peso que las que las tomaban durante la cena (103). Además la glucemia, la insulinemia y el HOMA-IR disminuyeron entre aquellas personas que tomaron un desayuno copioso (103).

Todos estos resultados sugieren que comer tarde puede afectar negativamente a la regulación metabólica y por tanto a la obesidad, y al éxito de las dietas de adelgazamiento.

Así pues, nuestro grupo y otros grupos de investigación hemos demostrado que no solo es importante “qué comemos”, sino que “cuándo comemos” también es importante en la obesidad y en la pérdida de peso (94, 102, 104).

## **5.1 Los ritmos circadianos**

Los ritmos circadianos (circa, alrededor y dianos, de día) son cambios físicos, mentales y conductuales que siguen un ciclo aproximado de 24 horas, y que responden, principalmente, a los cambios de luz y oscuridad en el ambiente de un organismo.

Las primera evidencia de un ritmo biológico data del año 1729, fue gracias al astrónomo francés Jean Jacques d’Ortous DeMarian que informó que los movimientos foliculares de la planta Mimosa púdica presentaban ritmos a lo largo del día, y que estos ritmos eran independientes de la luz solar (105).

Así, este investigador demostró que los movimientos de apertura y cierre de las hojas de esta planta se mantenían incluso en condiciones de oscuridad constante durante varios días consecutivos.

Pero no fue hasta la primera mitad del siglo XX, cuando se creó un nuevo campo de la ciencia: la llamada “Cronobiología”. Algunos de los primeros estudios fueron realizados en la mosca de la fruta *Drosophila*, por un ecologista Colin S. Pittendrigh (106). Gracias al estudio de los ritmos biológicos de este insecto, Colin S. Pittendrigh descubrió los principios básicos de la cronobiología moderna.

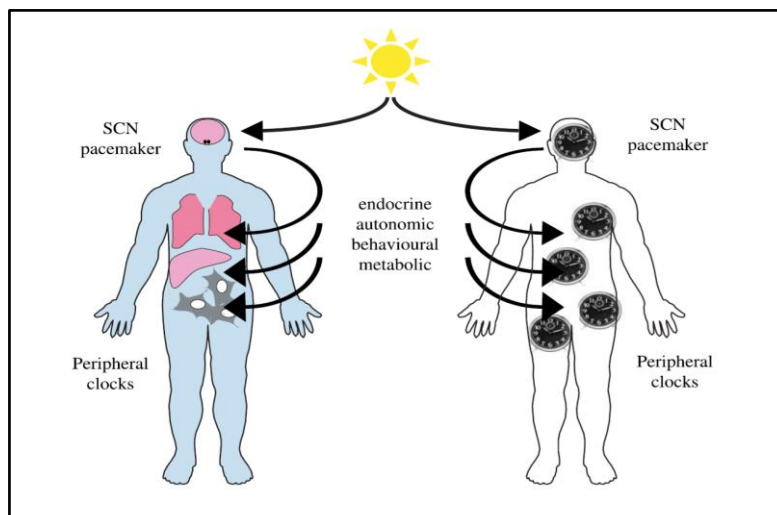
Los ritmos circadianos influyen en los ciclos de sueño-vigilia, la secreción de algunas hormonas como cortisol y melatonina, la regulación de la temperatura corporal y otras funciones relevantes.

El sistema circadiano de los mamíferos está compuesto por una red de estructuras jerárquicamente organizadas responsables de la generación de ritmos circadianos y de su sincronización con el entorno. Los ritmos diarios y estacionales están coordinados por un oscilador ‘maestro’ también conocido como “marcapasos central”, situado en el núcleo supraquiasmático (SCN) el cual se encuentra en el hipotálamo anterior (107).

El SCN se “reajusta” cada día mediante una señal periódica de luz/oscuridad. Cada neurona individual del SCN es un reloj circadiano, y todos estos relojes se sincronizan a su vez con la hora solar directamente por los aferentes retinales gracias a la existencia de una ruta no visual basada en las células ganglionares provistas del pigmento melanopsina en el tracto retinohipotalámico (108).

Aunque la luz (cambios luz/oscuridad) sea la principal señal entrante al SCN existen otras entradas periódicas, como son el horario de las comidas (ingesta/ayuno) y el ejercicio programado (actividad/reposo), capaces de poner en hora al sistema circadiano de mamíferos, en especial a los relojes circadianos periféricos presentes en diferentes órganos y tejidos. Y es que el marcapasos central, a su vez, sincroniza la actividad de varios relojes periféricos fuera del SCN mediante la secreción cíclica de hormonas y la actividad del sistema nervioso vegetativo (108).

Diversos estudios han demostrado que diferentes órganos implicados en la nutrición y la alimentación del ser humano, tales como el hipotálamo y las zonas del control de la ingesta, el estómago e intestino, el hígado e incluso el tejido adiposo, presentan ritmos circadianos comportándose como relojes periféricos (**Figura 2**). Estos ritmos circadianos, van a tener una gran importancia en el horario de todos los procesos metabólicos relacionados con la alimentación. Es por ello que el horario de la comida, importante sincronizador de estos relojes periféricos, puede ser determinante en el funcionamiento de nuestra fisiología y como consecuencia en la relación existente entre la cronobiología y la obesidad (35, 109).



**Figura 2.** Representación de la existencia de genes reloj en los distintos órganos. Vista esquemática de la coordinación circadiana a través del individuo, en la que el marcapasos primario del SCN arrastrado por el tiempo solar y por los aferentes retinales, mantiene y sincroniza los relojes de los tejidos en los órganos principales, mediante una mezcla de señales endocrinas, autonómicas y conductuales (relacionadas con la alimentación) (110).

Uno de los descubrimientos más importantes para esta área de investigación es la presencia de un reloj circadiano activo en el tejido adiposo (111, 112). Nuestros estudios mostraron que existe un componente temporal en la regulación de las funciones del tejido adiposo (112). De hecho, los estudios realizados por microarrays han demostrado que una elevada proporción de los



genes activos en el tejido adiposo sigue un patrón rítmico diario (113, 114).

Teniendo en cuenta que la alimentación es la principal fuente de energía para el tejido adiposo, el momento de la alimentación, en particular para las comidas de alta energía como es el caso del chocolate, puede ser decisivo, y un cambio en este momento podría tener consecuencias metabólicas para el desarrollo de la obesidad y la pérdida de peso (115).

El funcionamiento correcto de estos ritmos circadianos endógenos permite a los organismos predecir y anticiparse a los cambios medioambientales, así como adaptar temporalmente sus funciones conductuales y fisiológicas a estos cambios. En humanos, los hábitos sociales actuales, tales como la reducción del tiempo de sueño y el incremento de irregularidad interdiaria del sueño-vigilia (jet-lag, trabajo por turnos y un aumento de la exposición a la luz brillante durante la noche) o el elevado consumo de “snacks”, actúan sobre el cerebro induciendo una pérdida de la “percepción” de los ritmos internos y externos.

## **5.2 Cronotipo y técnicas de evaluación**

El cronotipo de un individuo ayuda a determinar la preferencia circadiana del sujeto (116, 117). Las diferencias entre el horario endógeno de un individuo y la hora local externa dan como resultado cronotipos que van desde matutinos (cronotipo temprano) hasta vespertinos (cronotipo tardío), pasando por un cronotipo intermedio también llamado indefinido (118). Los cronotipos tempranos tienden a funcionar mejor en la mañana, mientras que los cronotipos tardíos funcionan mejor en la noche (102). Las técnicas más utilizadas para determinar el cronotipo de un individuo son las siguientes.

### 5.2.1 Cronotipo subjetivo

El cronotipo se determina a través del uso de cuestionarios que clasifican al sujeto según su tipología circadiana. Los más utilizados son:

El cuestionario de Múnich (MCTQ), que determina el cronotipo tras calcular el centro del sueño para los días libres y de trabajo. El centro del sueño es uno de los marcadores más precisos de la fase circadiana, definida como la hora en el que ritmo alcanza su máximo valor (119). Este cuestionario consta de 17 preguntas sobre el comportamiento del ciclo sueño y vigilia, que abordan la hora de acostarse y levantarse por separado para días laborables y libres (117).

El cuestionario matutino-vespertino (Morning-Evening Questionnaire (MEQ)), que evalúa las preferencias de tiempo y horarios del individuo durante las 24 horas de un día. Consta de una escala de 19 ítems desarrollada por Horne y Östberg, con la que se obtiene una puntuación que clasifica al sujeto en matutino, vespertino o indefinido (120).

### 5.2.2 Cronotipo objetivo

Se emplean herramientas más fiables, no invasivas, fáciles de obtener y que no interfieran en la vida del sujeto. Las más utilizadas actualmente son:

Inicio de la subida de melatonina con luz tenue (Dim Light Melatonin Onset (DLMO)), que es una herramienta para medir la fase circadiana, es decir, el momento en que los valores de melatonina ascienden y mantienen sus concentraciones superiores a un umbral determinado que suele estimarse en 5 pg/ml (121). Se realiza en condiciones de luz tenue ya que la luz intensa es capaz de suprimir la secreción de melatonina. Se ha demostrado que el inicio de la secreción de melatonina en condiciones de luz tenue es el marcador más preciso para evaluar la fase del marcapasos circadiano (122). El gran número de muestras que hay que recolectar junto con el elevado coste de esta técnica, dificultan su uso.

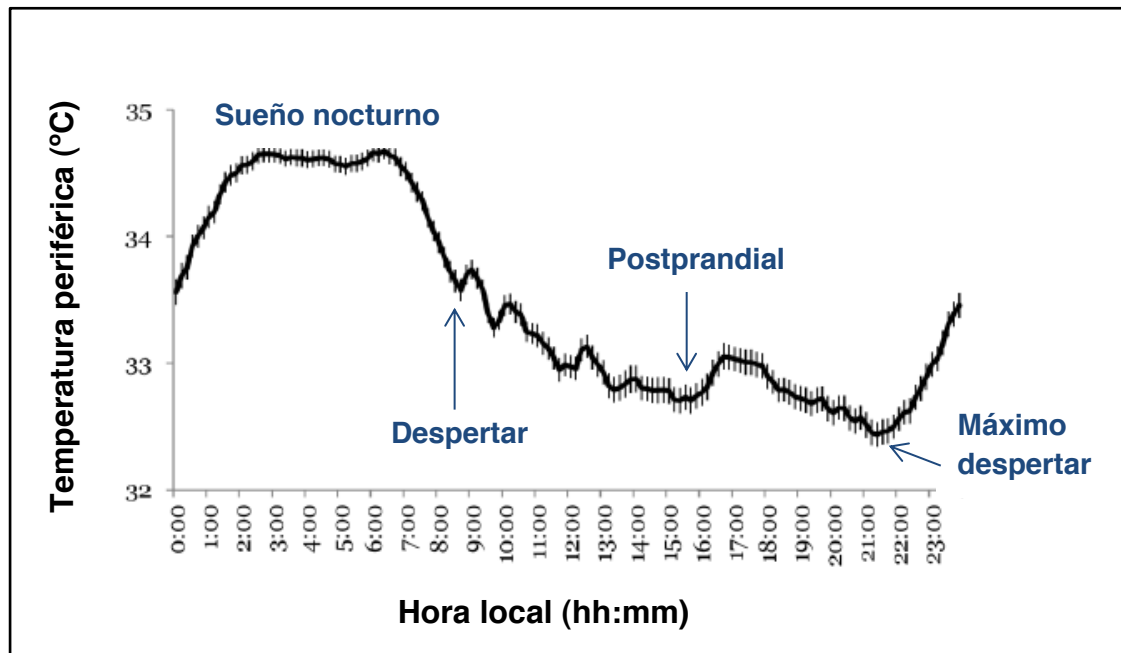
Actimetría, que es un método sencillo y no invasivo, basado en la obtención de un registro prolongado de datos a través de un dispositivo denominado actímetro, que registra y almacena información sobre actividad motora (A) y posición corporal (P). La monitorización se basa en cuantificar los movimientos realizados por el sujeto mediante medidas de la aceleración resultante de dichos movimientos. La representación gráfica del patrón de 24h de actividad y posición, se caracteriza por presentar valores bajos durante la noche (descanso) y valores más elevados durante el día (vigilia).

El actímetro se está utilizando en la actualidad como marcador de alteraciones en el sistema circadiano y su posible asociación con la enfermedad (123). La búsqueda de biomarcadores de salud circadiana ha llevado al desarrollo de algoritmos que cuantifican la robustez, la fase y la estabilidad de los ritmos de actividad/reposo. Entre ellos, el modelo cosinor paramétrico y el modelo no paramétrico son dos enfoques matemáticos que se utilizan en la actualidad y que son capaces de captar alteraciones en los ritmos de actividad/reposo asociadas con obesidad (124, 125).

La temperatura corporal, que medida de forma “central”, ha demostrado ser un marcador adecuado de los ritmos circadianos del individuo. Su medición continua es complicada pues requiere la ingesta de una cápsula termómetro, cuyas mediciones cambian en función de la velocidad de tránsito intestinal, que varía según los individuos. O bien, el uso de una sonda rectal durante 24h, lo que sólo es posible en complicados experimentos de laboratorio en condiciones controladas, con lo que no son representativas de la vida real del individuo (126, 127).

Una aproximación podría ser la medición de la temperatura periférica en la muñeca, o la medición de la temperatura distal, mediante el uso de dos dispositivos separados en el cuerpo, que miden la diferencia de temperatura entre ellos y permiten así eliminar el efecto de la temperatura ambiental (126, 128). Se considera, con algunas salvedades, que los ritmos diarios de temperatura corporal central y periférica son inversos, por lo que el máximo valor de un ritmo podría corresponderse con el mínimo para el otro (129, 130).

Aunque no debemos olvidar que la temperatura periférica, resulta también de la disipación por la piel de la temperatura central, por lo que a veces sus valores elevados son consecuencia también de un incremento de temperatura central. Para evaluar el ritmo de temperatura periférica en adultos se ha utilizado un sensor de temperatura denominado ibutton (34) (Thermochron iButton DS1921H, Dallas, Maxim, Dallas, T).



**Figura 3.** Ritmo de 24h de temperatura periférica en adultos. Datos tomados del Departamento de Fisiología de la Universidad de Murcia. Grupo de Nutrición. La representación gráfica del patrón circadiano de temperatura periférica se caracteriza por presentar un aumento de los valores de temperatura por la noche, con un patrón estable en forma de meseta durante el sueño nocturno con altas temperaturas, y un descenso pronunciado de la misma al despertar. Por la mañana permanecerá estable con valores bajos de temperatura y con una elevación en la hora asociada a la siesta, y coincidente con el periodo postprandial. Por último, se produce una zona de máximo despertar que corresponde a los valores mínimos de temperatura y que prepara para el sueño, ya que a partir de esta caída, la temperatura volverá a subir de nuevo con la entrada de la noche.

El TAP (Temperatura, Actividad y Posición), que se usa para evaluar el estado del sistema circadiano humano en condiciones normales de vida. Así, Ortiz-Tudela *et al.* (131) propusieron la integración de la temperatura, actividad y posición en una sola variable, a la que denominaron TAP ya que combina la temperatura de la muñeca (T), la actividad física (A) y la posición (P) y ha demostrado ser un método adecuado para evaluar el cronotipo, el estado del sistema circadiano y las características del sueño.

Algunos de los problemas que presenta la actimetría, además de los fallos en su funcionamiento es que, a la hora medir el centro del sueño, tiende a subestimar el tiempo de vigilia y por tanto a sobreestimar el sueño (132). Además, con el actímetro no es posible saber cuándo los sujetos se quitan sus dispositivos (133). La utilización conjunta de la actimetría con la temperatura periférica puede ser muy útil ya que esta última se considera como un buen marcador de sueño (134). Un reciente documento de consenso respaldado por el Instituto Nacional del Corazón, Pulmones y Sangre, el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Sociedad de Investigación del Sueño (134), ha declarado que la temperatura periférica es un método novedoso y no invasivo para medir la hora de la fase circadiana y los estados de sueño y vigilia, por lo que es interesante su utilización en combinación con la actimetría.

En comparación con la actimetría convencional, se ha demostrado que el TAP es clínicamente superior en la evaluación objetiva del sueño (133). Mejora la sensibilidad, la especificidad y la precisión en comparación con la actividad, la posición o la temperatura corporal, por separado y minimiza los efectos de enmascaramiento (131). El uso del TAP ha sido validado en adultos sanos y enfermos con determinaciones de melatonina con luz tenue (DLMO) y con polisomnografía (135).

El cortisol, es la hormona circadiana por excelencia, es decir sus concentraciones van variando a lo largo de día y se considera un marcador del funcionamiento del reloj central. Resulta ventajoso para su determinación que las mediciones se pueden hacer en saliva, aunque hay que hacer diferentes medidas a lo largo del día.

Se le conoce también como la hormona del estrés. Sin embargo, tiene muchas más funciones reguladoras en todo el organismo, incluido el cerebro. El cortisol también presenta efectos sobre la regulación de la energía, en los procesos metabólicos y en el funcionamiento del sistema inmune e inflamatorio, entre otros (136). esta hormona circadiana se considera un marcador adecuado para la evaluación de la salud cronobiológica, debido a que presenta un patrón circadiano robusto que alcanza su máximo valor a la hora del despertar y va disminuyendo a lo largo del día, por lo que por la noche sus valores suelen ser menores, siendo la relación normal entre cortisol de la mañana y el de la noche de 3. Es por ello que en cronobiología interesa determinar al menos el cortisol al despertar y al final del día. Un ritmo con poco cambio o aplanado, se considera como marcador de cronodisrupción.

La melatonina, es una hormona muy utilizada en cronobiología. Se libera en la glándula pineal como respuesta simpática a la acción del núcleo supraquiasmático y se le ha llamado hormona de la noche. Es el marcador circadiano por excelencia, sobre todo el inicio de su secreción (DLMO), por lo que sus valores deberán presentarse elevados por la noche y bajos durante el día. Sin embargo, hay que tener en cuenta que su actividad está condicionada por agentes ambientales como la luz (137) y el consumo de estimulantes como la cafeína (138), entre otros.

La secreción de melatonina se relaciona con el sueño, coincide con una caída de temperatura corporal central y con una disminución en el grado de excitación y en el rendimiento del individuo (139). Estudios previos han confirmado que las concentraciones de melatonina son un buen marcador del cronotipo (140).

### 5.3 La cronodisrupción

La cronodisrupción (CD) puede definirse como la ruptura de la sincronización entre los ritmos circadianos internos y los ciclos de 24 horas medioambientales (141). Vivimos en una sociedad moderna de 24 horas 7 días a la semana, que se caracteriza por una exposición a la luz artificial. Esto nos ha permitido vivir con luz en horas que antes se destinaban al sueño, y ha provocado un retraso en el horario de las comidas y en la hora de acostarse.

En nuestra sociedad la CD se produce por varias situaciones como el *jet-lag* y el trabajo por turnos, pero también por otras como la contaminación lumínica nocturna o la realización de actividades lúdicas, preferentemente durante la noche (108). En la actualidad es evidente el efecto de la CD sobre la salud humana. La evidencia actual sugiere que la CD está estrechamente asociada con un aumento del riesgo de desarrollar ciertas enfermedades o con el empeoramiento de patologías preexistentes como el envejecimiento prematuro, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, y con la obesidad y el síndrome metabólico (112).

Tal y como comentábamos anteriormente, la hora de la ingesta de alimentos, es un sincronizador de los relojes periféricos y está asociada con la regulación del peso corporal, la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a glucosa. Comer tarde se asocia con CD, ya que se produce una disminución del gasto de energía en reposo, disminución de la oxidación de carbohidratos en ayunas, disminución de la tolerancia a glucosa, disminución del perfil diario en las concentraciones de cortisol libre (ritmos aplanados) y disminución de la temperatura; todo esto conduce a la desincronización interna de los relojes centrales y periféricos (102).

Varios mecanismos biológicos han sido descritos para explicar la relación causal entre comer tarde y una salud cardiometabólica adversa, incluyendo cambios en el gasto de energía basal, termogénesis inducida por la dieta, oxidación del sustrato, metabolismo de la glucosa, patrón de temperatura corporal medido en la muñeca, consumo de alimentos coincidiendo con elevada melatonina, y cambios de fase de los relojes periféricos, incluidos los del tejido adiposo (101).

En resumen podemos afirmar que, el sistema circadiano nos mantiene sincronizados con el día de 24 horas y las funciones fisiológicas muestran ritmos endógenos orquestados por el reloj circadiano. El momento de la comida puede influir en los ritmos circadianos (142) y comer una cantidad bastante grande de chocolate por la noche o por la mañana puede tener un efecto diferente en el sistema circadiano, los relojes periféricos de diferentes órganos y tejidos y, en consecuencia, sobre el peso corporal y los rasgos metabólicos. Se ha demostrado que comer en el momento "incorrecto" es un factor determinante para la pérdida de sincronía entre el sistema circadiano y los diferentes procesos metabólicos que afectan la energía y el metabolismo del tejido adiposo y el riesgo de obesidad (143-146).

## 6. MENOPAUSIA

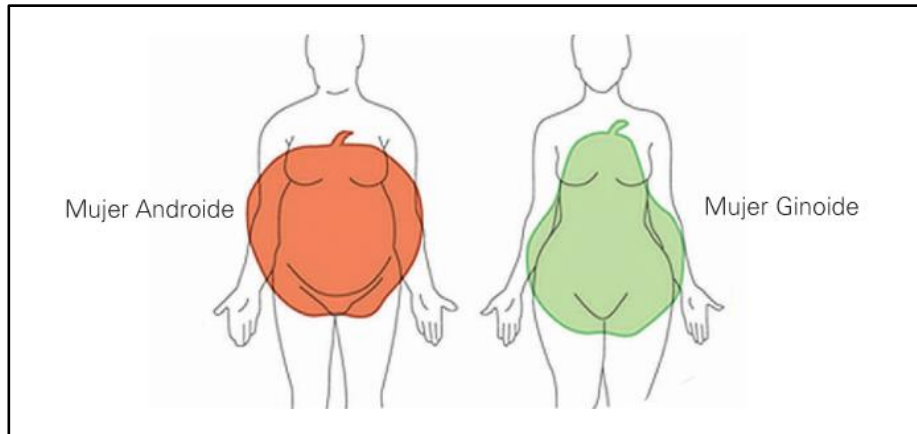
La menopausia es una época importante en la vida de la mujer que se caracteriza por el cese definitivo de la actividad folicular ovárica y en consecuencia por la desaparición de la menstruación (amenorrea), y pérdida de la capacidad reproductiva. Se considera la edad media de comienzo de la menopausia los 51 años (147).

El aumento de la esperanza de vida de la mujer junto a los avances terapéuticos actuales, nos colocan ante un nuevo marco epidemiológico, ya que las mujeres van a pasar una parte sustancial de su vida en un estado post-menopáusico (148).

Desde el punto de vista hormonal se evidencia un cambio importante, especialmente en lo que respecta a las hormonas sexuales las cuales se alteran drásticamente. Un ejemplo es un estudio desarrollado por Toth *et al.* (149) en 2020 en el que se mostró una abrupta caída en los estrógenos.

Ahora bien, uno de los factores más importantes que puede influir en el deterioro de la salud de las mujeres es que a medida que alcanzan la mediana edad y entran en la transición menopáusica se produce una alteración en la distribución de grasa corporal que transforma una distribución glúteo-femoral (ginoide) en una distribución visceral (androide) (**Figura 4**) (150).





**Figura 4.** Diferentes tipos de obesidad según la distribución de la grasa corporal. Link: <https://www.facebook.com/1269939939742203/photos/pcb.1270561389680058/1270559533013577/?type=3&theater>.

Gracias a otra investigación de Toth *et al.* (151) sabemos que las mujeres en la menopausia temprana tienen un 49% más de grasa intra-abdominal en comparación con las mujeres premenopáusicas. Se ha demostrado también un aumento en la incidencia de enfermedades metabólicas y sus comorbilidades en la mujer postmenopáusica, época en la fisiología de la mujer en que los cambios en las hormonas sexuales juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (152, 153).

No debemos olvidar que la menopausia es una consecuencia normal de la edad en la mujer. Se trata de un proceso en el que se suceden cambios hormonales y fisiológicos (154, 155) que frecuentemente provocan un desconcierto importante en la mujer. En ocasiones resulta difícil distinguir cuáles de estos cambios son consecuencia de la menopausia y cuáles son debidos al proceso de envejecimiento.

El envejecimiento es una situación fisiológica que está asociada además con acumulación de grasa corporal, disminución de actividad física y disminución del gasto de energía. En definitiva, y tal y como puso de manifiesto un trabajo de Kennedy RL *et al.* (156) en el año 2004, el envejecimiento predispone a la acumulación de grasa y a la redistribución de la misma.

La composición corporal también varía durante la menopausia y se produce una disminución significativa de tejido magro y un aumento de tejido adiposo, esto junto con el menor grado de actividad física, hace que con el envejecimiento se presente una relativa tendencia a aumentar de peso (157).

Conviene considerar que una acumulación de grasa abdominal se asocia con anomalías metabólicas, incluida la resistencia a la insulina y la dislipemia, que puede predisponer a la mujer a un mayor riesgo cardiovascular (158) y a un aumento del riesgo de sufrir síndrome metabólico.

### **6.1 Menopausia y cronobiología**

Investigaciones realizadas en el ámbito de la cronobiología han demostrado que con el paso de los años el sistema circadiano humano manifiesta una pérdida de precisión temporal que contribuye a un conjunto de patologías relacionadas con la edad (159, 160). Las personas de edad avanzada presentan déficits pronunciados en la amplitud de los ritmos circadianos, en el horario de expresión de los genes reloj, y en el ajuste del núcleo supraquiasmático a la hora local. Este deterioro en el sistema circadiano se manifiesta en alteraciones del ciclo sueño-vigilia y por tanto en fallos en la fisiología de todo el sistema (161).

Una investigación desarrollada por nuestro grupo mostró los cambios que se producen durante la menopausia en la expresión de los genes del tejido adiposo y más específicamente en la expresión de los genes reloj (162). Concluyendo que las mujeres postmenopáusicas presentan una pérdida de coordinación circadiana, proceso que ocurría en paralelo a la mencionada redistribución del tejido adiposo y a un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico (162).

Por otra parte Rangel-Zuniga *et al.* en el año 2017 (163), llevaron a cabo una investigación con el fin de determinar si los cambios fisiológicos observados en la menopausia eran consecuencia de la menopausia en sí o del envejecimiento. Los resultados obtenidos sugirieron que el estrés oxidativo inducido por la menopausia era paralelo a una disrupción en el reloj circadiano

en mujeres, y que algunas de las diferencias en el estrés oxidativo observadas entre las mujeres pre- y postmenopáusicas eran consecuencia del envejecimiento e independientes de la menopausia.

Por otra parte, la acumulación de grasa abdominal se ha relacionado también con la cronodisrupción (164). Debido al singular papel de los diferentes depósitos de grasa (subcutánea y visceral) en las alteraciones de la obesidad, el metabolismo específico de ambos tipos de grasa corporal podría estar impulsado por diferentes ritmos cronobiológicos (165). Se ha visto que las mujeres que tienen obesidad visceral presentan sutiles perturbaciones en los ritmos de cortisol, presentan concretamente una disminución considerable en la variabilidad diaria en los valores de esta hormona. Esto sugiere una respuesta alterada del eje suprarrenal hipotalámico-hipofisario que puede conducir a un patrón corporal androide (166).

Con el fin de estudiar si las mujeres postmenopáusicas presentaban diferencias en las variables circadianas y en la calidad del sueño, y su relación con la distribución de la grasa corporal, nuestro grupo de investigación llevó a cabo un estudio con 177 mujeres (127 premenopáusicas y 50 postmenopáusicas), demostrando que las mujeres postmenopáusicas tenían una menor robustez circadiana y una peor calidad del sueño comparadas con las mujeres premenopáusicas. Las mujeres postmenopáusicas eran además más matutinas (167).

De estos estudios se deduce que durante la menopausia podrían ser útiles estrategias que se centraran en la regulación del sistema circadiano como enfoque terapéutico para prevenir o mejorar las alteraciones metabólicas (162).

## **7. MICROBIOTA**

En los últimos años han aumentado vertiginosamente las investigaciones sobre microbiota intestinal. Como consecuencia de ello sabemos que la flora bacteriana del tracto digestivo es diversa, abundante y afecta a la salud, y que la dieta juega un papel importante en su desarrollo y mantenimiento (168, 169).

Estudios recientes en animales y humanos, como el desarrollado en mujeres por Collado MC *et al.* (170) en 2008, indican que la composición y función de la microbiota intestinal puede estar involucrada en la obesidad, la pérdida de peso y las alteraciones metabólicas. Incluso un estudio realizado en individuos obesos por Damms-Machado A *et al.* (171) en el año 2015 ha demostrado que la pérdida de peso mejora el perfil de la microbiota del individuo obeso hacia un perfil más propio de un fenotipo bajo en grasa. Por otra parte, la composición y diversidad de la microbiota salival también se ha relacionado con la obesidad y las alteraciones metabólicas asociadas (172, 173).

Las especies bacterianas que conforman la microbiota intestinal se asocian con la producción de ácidos grasos de cadena corta que mejoran la mucosa en el colon y la función barrera intestinal (174, 175).

Un estudio de Strat KM *et al.* (176) ha explicado los efectos del chocolate, en concreto del chocolate negro, sobre el metabolismo, como consecuencia de su alto contenido polifenólico, por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y también a través de cambios en la microbiota. Los polifenoles modulan la microbiota intestinal y se comportan como prebióticos. Un prebiótico es un ingrediente alimenticio no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando el crecimiento y la actividad de un número limitado de bacterias en el colón (177).

La investigación desarrollada por Tzounis *et al.* (178) mostró que la incubación del polifenol catequina en muestras fecales de individuos sanos aumentaba significativamente el crecimiento del grupo *Clostridium coccooides*, *Eubacterium rectal*, *Bifidobacterium spp.*, y *Escherichia coli*, a la vez que tenía un efecto inhibitor significativo en el crecimiento del grupo *Clostridium histolyticum* (178).

Durante años no se tenían conocimientos sobre el impacto de los cambios que produce el momento de la ingesta de alimentos sobre la microbiota del tracto digestivo. Estudios en roedores sobre patrones de alimentación (179), y en humanos sobre la distribución diaria de la ingesta de energía y la abundancia de especies microbianas intestinales (180), han

proporcionado pruebas convincentes para apoyar la hipótesis de que varios aspectos relacionados con el momento de comer pueden afectar a la microbiota, y podría ser uno de los mecanismos que expliquen la disfunción metabólica inducida por la alimentación tardía.

Recientemente, en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación hemos demostrado que el momento de la ingesta puede cambiar los ritmos diarios de diversidad y abundancia de la microbiota, con patrones opuestos entre comer temprano o tarde (181). Se realizó un estudio aleatorio y cruzado en 10 mujeres normopeso, jóvenes y sanas para evaluar el efecto del horario de la ingesta de alimentos sobre la microbiota humana en las muestras de saliva y heces. Resultado de este estudio fue que comer tarde la comida principal invertía el ritmo diario de la diversidad de la microbiota salival hacia un patrón opuesto a comer pronto y en una dirección similar a la observada en la obesidad, en la inflamación y en la resistencia a la insulina, lo cual puede tener un efecto nocivo sobre el metabolismo del individuo. Este trabajo proporciona razones científicas para el estudio de los ritmos de 24h de la microbiota como un biomarcador de riesgo metabólico y también como diana terapéutica para la obesidad y el síndrome metabólico (181).



# OBJETIVOS

---





## 1. Estado actual e hipótesis de partida

Clásicamente se le han atribuido al cacao y sus derivados efectos beneficiosos para la salud, concretamente al chocolate puro. Por otra parte es conocido el temor que genera este alimento por su posible efecto sobre el peso corporal y el aumento de la glucemia, ya que presenta un elevado contenido en grasa y azúcar y una gran densidad calórica.

En la actualidad, y fruto de los resultados obtenidos de numerosos trabajos de investigación, existen resultados contradictorios en relación al efecto del chocolate sobre el peso corporal, la circunferencia de cintura y sobre otras variables antropométricas y metabólicas.

Además, la mayoría de los estudios se han realizado con chocolate negro, mientras que el chocolate con leche es el de máximo consumo.

Por todo ello, al plantear esta tesis doctoral, queremos dar respuesta a una serie de interrogantes en relación a los efectos de la ingesta de chocolate con leche sobre diferentes marcadores de salud del individuo, incluyendo marcadores de salud cronobiológica, y si estos efectos cambian en función del momento de la ingesta de chocolate.

Nos interesa principalmente determinar estos efectos en mujeres postmenopáusicas, ya que se trata de una edad crítica en la mujer para la obesidad y para el riesgo metabólico.

Esperamos encontrar cambios en la ritmicidad circadiana de variables como la temperatura corporal y actimetría, ambos marcadores de salud circadiana, ya que nuestros estudios previos han mostrado que estas variables están influenciadas por el momento de la ingesta.

Además, nuestro equipo de investigación ha demostrado cambios en los ritmos diarios de la microbiota intestinal con la hora de la comida, por lo que también estamos interesados en estudiar la microbiota intestinal de las mujeres objeto de estudio.

La hipótesis es que el chocolate por la mañana o por la tarde/noche puede afectar al equilibrio energético y también al peso corporal o a la

distribución de grasa corporal en mujeres postmenopáusicas mediante cambios en la ingesta de energía, en la oxidación del sustrato, en variables circadianas relacionadas con el sueño, así como en la composición de la microbiota intestinal y su actividad metabólica.

## **2. Objetivos específicos**

**Objetivo 1:** Demostrar si la hora a la que se toma el chocolate influye sobre el peso corporal, sobre la composición corporal y sobre otros parámetros antropométricos como es la circunferencia de cintura, en mujeres que han pasado la menopausia (postmenopáusicas).

**Objetivo 2:** Estudiar los posibles mecanismos implicados en los cambios de peso corporal o distribución de grasa corporal tras la ingesta de chocolate en los diferentes momentos (mañana y noche). Se estudiarán aquellos mecanismos relacionados con:

2.1 La ingesta energética.

2.2 El gasto energético.

2.3 El sueño y variables circadianas.

**Objetivo 3:** Analizar los posibles efectos metabólicos del chocolate sobre la oxidación de sustratos y su diferencia en función de la hora de ingesta.

**Objetivo 4:** Evaluar los posibles efectos del chocolate sobre la glucemia tras la ingesta de chocolate en las condiciones de mañana y noche.

**Objetivo 5:** Estudiar los efectos del chocolate y su hora de consumo sobre la microbiota intestinal (composición y función).

# MATERIAL Y MÉTODOS

---



## 1. POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

Para llevar a cabo los objetivos de este trabajo se seleccionaron diecinueve mujeres postmenopáusicas con una edad de  $52 \pm 4$  años y con un peso inicial de  $65,5 \pm 10,5$  kg, un índice de masa corporal (IMC) de  $25,0 \pm 3,7$  kg/m<sup>2</sup>, y un porcentaje de grasa corporal de  $32,7 \pm 5,9\%$ , procedentes de una zona Mediterránea en España (Murcia), las cuales estaban siguiendo sus hábitos dietéticos habituales (*ad libitum*) (Trial Registration: Chocolate and Menopause Time (ONTIME-CHOC) estudio (ClinicalTrials.gov: #NCT03949803)).

El estudio se realizó con mujeres postmenopáusicas, con el fin de evitar variaciones en los resultados debidas a los cambios hormonales típicos del ciclo menstrual y por ser una etapa de riesgo metabólico en la mujer.

Hemos considerado como mujeres postmenopáusicas, aquellas con amenorrea durante al menos 12 meses, que tuvieran los valores plasmáticos de  $\beta$ -estradiol inferiores a 150 pmol/l y de FSH (Hormona folículo estimulante) superiores a 15 UI/l. Se excluyeron del estudio aquellas mujeres que presentaban menstruaciones normales o que, en cualquier caso, hubieran tenido como mínimo 1 ciclo menstrual durante el año anterior.

Los criterios de inclusión en el presente trabajo fueron:

- Edad: mayor de 45 años y menor de 65.
- Con menopausia: todas presentaron ausencia de menstruación durante el último año.
- Que les guste el chocolate con leche.

Los criterios de exclusión fueron:

- Presencia de enfermedad del sistema endocrino, renal, hepático, o enfermedades psiquiátricas.
- Consumo de medicamentos u otros tratamientos farmacológicos.

Las características generales de las voluntarias se definen en la **Tabla 9**.

**Tabla 9. Características generales de la población al inicio del tratamiento.**

	Media	DS
<b>General variables antropométricas</b>		
Edad (años)	52	4
Peso (kg)	65,5	10,5
Altura (m)	1,62	0,05
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25	3,7
Cintura (cm)	94,9	9,9
Cadera (cm)	104,3	8,1
ICC	0,9	0,06
Grasa corporal (%)	32,7	5,9
Índice de masa visceral	7,1	2,4
<b>Valores analíticos en ayunas</b>		
Glucosa (mg/dl)	91,9	10,1
Insulina (UI/ml)	5,5	2,2
Triglicéridos (mg/dl)	90,2	37,2
Colesterol Total (mg/dl)	226,5	40,7
HDL-colesterol (mg/dl)	87,9	15,9
LDL-colesterol (mg/dl)	120,5	30,2
VLDL-colesterol (mg/dl)	18	7,4
<b>Ingesta</b>		
Energía total ingerida (kcal/día)	1686,3	387,1
Carbohidratos (% energía total)	38,1	6,5
Lípidos (% energía total)	45,1	6,7
Proteínas (% energía total)	15,7	1,7
Carbohidratos (g/día)	161,8	43,6
Lípidos (g/día)	84,9	25,3
Proteínas (g/día)	65,9	14,7
Puntuación de Dieta Mediterránea	3,7	1,2
IMC: Índice de Masa Corporal; ICC: Índice Cintura Cadera; HDL: Lipoproteína de alta densidad; LDL: Lipoproteína de baja densidad; VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.		

Además, todas las participantes fueron informadas de los métodos y objetivos del proyecto, y dieron su consentimiento informado tanto para la participación en el mismo, como para la utilización de los resultados obtenidos, de acuerdo con los principios recogidos en la Declaración de Helsinki, y siguiendo las normas del Comité Ético de la Universidad de Murcia (UMU). Así mismo, se garantizó la total confidencialidad de todos los datos e informaciones relativas a las participantes, tal y como se observa en la Ley Orgánica para la

Regulación del Tratamiento Automatizado de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 5/1992).

### **1.1 Reclutamiento y adhesión al experimento**

El proceso de reclutamiento de las participantes se realizó a través de las redes sociales. Tras un primer contacto con ellas por la red social "Facebook" comenzó una relación telefónica con el fin de fidelizarlas.

Inicialmente fueron 30 las mujeres que se ofrecieron voluntarias para participar en este trabajo. De las 30 voluntarias se excluyeron 6 por diversos motivos:

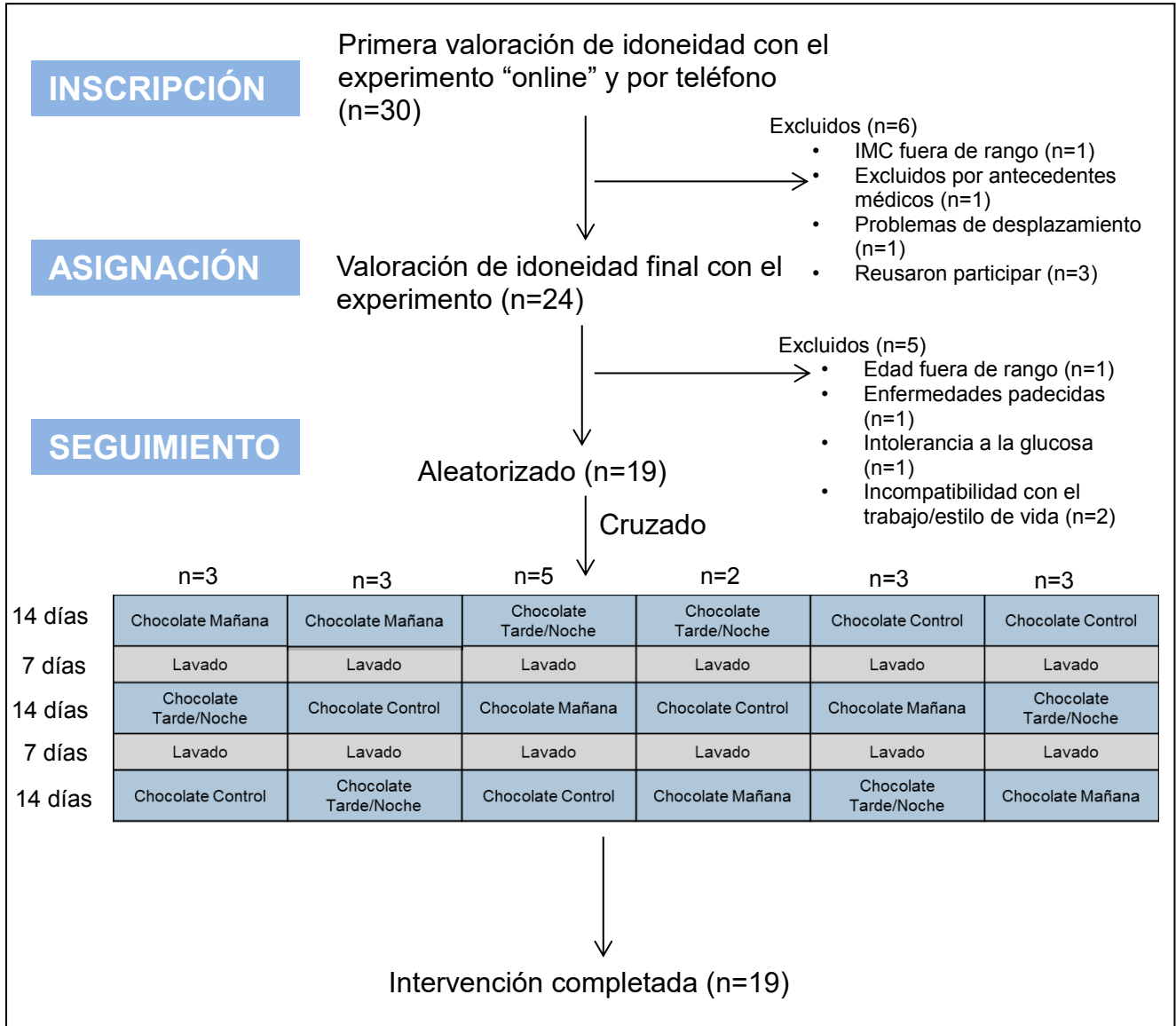
- Una mujer fue excluida porque su IMC estaba fuera de rango.
- Una mujer fue excluida por causas relacionadas con su historial médico.
- Una mujer fue excluida debido a dificultades para poder desplazarse.
- Tras explicarles el diseño del estudio, 3 mujeres declinaron la invitación a participar.

Finalmente, del total de 30 mujeres fueron 24 las que dieron su consentimiento para participar.

De esta muestra inicial de 24 participantes, 5 mujeres no completaron la intervención. Varias razones estuvieron involucradas:

- Una mujer estaba fuera del rango de edad.
- Una participante abandonó por causas relativas a una enfermedad padecida con anterioridad (cáncer) por la que aún estaba en tratamiento con determinados medicamentos incompatibles con el experimento.
- Durante la primera fase de la intervención los valores de glucosa de una voluntaria aumentaron considerablemente cuando tomó chocolate, motivo por el cual abandonó el experimento.
- Dos participantes no terminaron el ensayo debido a incompatibilidades con el trabajo/ requisitos de vida.

Así pues, fueron 19 las mujeres que terminaron el experimento del total de 24 que lo comenzaron (Véase **Figura 5**).



**Figura 5.** Representa las tasas de participación y el organigrama del experimento.

## 2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El estudio se realizó siguiendo un protocolo de diseño aleatorio y cruzado. El interés de este tipo de estudio radica en que nos permite analizar la repuesta metabólica en la misma persona durante las dos condiciones: mañana y noche,



y comparar con el control. Así pues, si existe algún cambio significativo entre estas dos condiciones podremos concluir que es consecuencia de la hora de la ingesta de chocolate. La aleatorización fue realizada por el personal de la UMU con tamaño de bloque 3 en un diseño equilibrado por un software ejecutado por ordenador (<http://www.randomization.com>).

Durante cuatro semanas las participantes tomaron 100 gramos de chocolate Nestlé extrafino<sup>®</sup>. Elegimos esta cantidad basándonos en estudios previos realizados en humanos en los que usaron 100 gramos de chocolate/día (32) y con el objetivo de conseguir que las voluntarias tomaran el 30% de la energía de su dieta habitual en forma de chocolate con leche. Un estudio previo realizado en animales (104) mostró que una dosis de chocolate que equivalía al 30% de la ingesta de calorías totales era capaz de actuar sobre el sistema circadiano y producir modificaciones.

Durante el desarrollo del experimento las voluntarias cumplieron un total de tres condiciones que consistían en:

1. Tomar el chocolate por la mañana, durante la primera hora al levantarse en un periodo de dos semanas consecutivas (MC).
2. Tomar el chocolate por la noche, durante la hora antes de acostarse en un periodo de dos semanas consecutivas (EC).
3. Seguir sus hábitos sin chocolate comiendo *ad libitum* durante dos semanas consecutivas (N).

Además, hubo una semana de “limpieza” entre cada condición del experimento, en la que seguían su dieta habitual sin chocolate (Figura 5).

Al comienzo del experimento hubo una semana basal de adaptación sin chocolate a la que llamamos “baseline”.

La duración del estudio completo para cada participante fue de 9 semanas.

En las semanas de intervención con chocolate (mañana o noche), a las voluntarias se les permitió tomar chocolate solo durante un intervalo de tiempo de 1 hora. Sin embargo podían tomar otros tipos de dulce sin chocolate en

cualquier momento del día. Durante las semanas de control y lavado, las voluntarias no tenían permitido tomar chocolate, pero podían tomar cualquier tipo de dulce sin chocolate.

La composición del chocolate con leche consumido fue 18,1 g de cacao, 31 g de grasa, 58,4 g de carbohidratos (de los cuales 57,5 g son de azúcar), 6,3 g de proteínas y 1,8 g de fibra por cada 100 g de chocolate. El chocolate (100g) también presentaba 215 mg de teobromina, 2,06 mg de cafeína, y 854,34 mg de polifenoles totales (principalmente epicatequina y catequina).

### **3. MEDIDAS GENERALES**

Las voluntarias se sometieron a las siguientes pruebas y mediciones.

#### **3.1 Antropometría**

Todas las mediciones fueron realizadas en el mismo momento del día en todas las condiciones (primera hora de la mañana).

El peso corporal fue determinado al comienzo (primer día), en la mitad (octavo día) y al final (último día) de cada condición, las voluntarias estaban descalzas y llevaban ropa ligera. Para pesar a las participantes se usó una balanza digital con un intervalo de error de 100 gramos.

La altura se midió el primer día del estudio con un estadiómetro tipo Harpende (rango 0,70-2,05 m) (Holtain Ltd, Bryberian, Crymmich, Pembrokeshire, UK). Cada participante estaba descalza y erguida, con la cabeza alineada según el plano de Frankfurt (siguiendo la línea tragocomisural) y en las mismas condiciones ambientales que la pesada.

A partir del peso y la talla de las participantes se determinó su Índice de Masa Corporal (IMC) según la fórmula:

$$\text{IMC} = \text{Peso (kg)} / \text{Altura}^2 \text{ (m)}$$

### 3.2 Determinación del porcentaje de grasa corporal

El último día de cada condición se determinó la grasa corporal total (en kg y %) mediante impedancia bioeléctrica. El equipo empleado para ello fue TANITA MC 180 MA (Tanita Corporation of America, Arlington Heights, IL, USA).

El TANITA analiza la bioimpedancia mediante el contacto de los pies y las manos con unos electrodos. La técnica de análisis por bioimpedancia se basa en el hecho de que los tejidos magros tienen un alto contenido en agua y electrolitos, y por tanto, funcionan muy bien como conductores eléctricos (182). En cambio, la materia grasa tiene un bajo contenido de agua corporal, y por lo tanto, no funciona como conductor de señales eléctricas. De esta manera es posible medir la resistencia al flujo de la corriente eléctrica induciendo una señal eléctrica de baja energía y de alta frecuencia (50 kHz, 500 microamperios). Esta corriente pasa a través de los electrodos.

La medida de la resistencia se relaciona directamente con el volumen del conductor, lo que se emplea para determinar el total de agua corporal, materia magra y por diferencia la materia grasa del organismo. El porcentaje de grasa corporal se calcula mediante una ecuación que combina medidas de impedancia y peso con información de estatura, sexo y edad.

La medición se realizó con las voluntarias descalzas y cumpliendo las siguientes condiciones para asegurar una mejor fiabilidad de los datos (183),

- No haber ingerido alcohol 48 horas antes de la prueba
- No haber realizado ejercicio físico intenso 12 horas antes de la prueba
- No haber comido ni bebido 4 horas antes de la prueba
- Haber orinado 30 minutos antes de la prueba
- No haber ingerido diuréticos 7 días antes de la prueba

Además del porcentaje de grasa corporal, la bioimpedancia da información de otros parámetros de composición corporal, como el contenido total de agua, el peso de la masa grasa y el peso corporal libre de grasa, entre otros.

La distribución de la grasa corporal se determinó al mismo tiempo que el porcentaje de grasa corporal mediante el cálculo de los siguientes perímetros:

- Circunferencia de cintura: medición realizada entre el margen inferior de las costillas y la cresta ilíaca.
- Circunferencia de cadera: medición realizada en la circunferencia más amplia sobre el trocante mayor.

Todas las medidas se realizaron con una cinta métrica flexible e inextensible. A partir de estas medidas se calculó:

Índice Cintura Cadera (ICC)= Circunferencia cintura/Circunferencia cadera

Según el perímetro de la cintura se puede dividir a la población en obesidad androide o visceral (circunferencia de cintura > 94 cm en hombres y 80 cm en mujeres), u obesidad ginoide o glúteo-femoral (ICC < 94 cm en hombres y < 80 cm en mujeres).

### 3.3 Ingesta dietética (cantidad y horario)

Para la determinación de la ingesta dietética se emplearon diferentes herramientas subjetivas y objetivas.

- Mediciones subjetivas: La ingesta alimentaria se registró de forma continua durante los 14 días de duración de cada condición. Cada una de las participantes llevó a cabo un auto-registro dietético de todo lo que comía durante los 14 días. Las voluntarias registraron las cantidades y el horario de cada comida.

- Determinaciones objetivas: Resultaron muy útiles las fotografías con sello de tiempo que cada participante capturó en cada momento de la ingesta con una aplicación de teléfono móvil (Dieta Garaulet online APP).

La ingesta total de energía, la composición de macronutrientes y el contenido de cafeína y polifenoles durante los 14 días de cada condición fueron analizados con el programa de evaluación nutricional Nutrilet considerando y excluyendo la ingesta de chocolate (**Tabla 10**). Este programa permite a través de la información de alimentos introducida por las participantes, determinar la

cantidad de energía y la composición en macro- y micronutrientes, también nos permite calcular el Score de Dieta Mediterránea, el índice glucémico y la variedad de la dieta (<https://nutrilet.garaulet.com>).

La ingesta de varios grupos de alimentos y los “scores” dietéticos fueron estimados a partir del registro dietético de 14 días de cada condición, incluyendo el “score” de Dieta Mediterránea que ha sido previamente descrito (184, 185) y se compone de 8 grupos de alimentos: 1) verduras; 2) legumbres (lentejas, garbanzos, habichuelas y guisantes); 3) frutas y frutos secos; 4) productos lácteos (leche, yogur, y queso); 5) cereales; 6) carnes, embutidos y huevos; 7) pescado y 8) vino.

**Tabla 10: Características dietéticas y contenido en polifenoles y cafeína en cada condición del estudio, considerando y excluyendo la ingesta de chocolate.**

Grupos de alimentos y contenido en polifenoles	Condición del experimento						
	Control		Mañana		Tarde/Noche		Valor P
Dieta Mediterránea (grupos de alimentos)	Media	EEM	Media	EEM	Media	EEM	
Puntuación de Dieta Mediterránea	3,67	0,3	3,89	0,29	3,78	0,348	0,673
Legumbres (g/día)	10,1	9,62	19,54	31,21	14,54	11,92	0,376
Frutos secos (g/día)	11,63	13,76	6,34	6,33	11,5	22,3	0,512
Verduras y hortalizas (g/día)	220,55	69,74	213,13	81,12	225,15	81,24	0,896
Productos lácteos (g/día)	239,1	120,12	238,16	114,21	218,39	100,09	0,822
Cereales y patatas (g/día)	145,94	74,08	132,37	63,92	137,03	65,58	0,832
Carne y huevos (g/día)	116,87	31,25	112,39	31,54	119,85	38,9	0,805
Pescado (g/día)	60,4	27,9	67,07	26,64	52,55	23,67	0,257
Frutas (g/día)	213,71	121,67	179,76	143,99	195,19	119,67	0,733
Vino (g/día)	25,12	35,12	22,01	35,1	30,24	55,97	0,847
Café y té (g/día)	32,5	18,26	34,84	23,4	35,6	38,61	0,942
Chocolate (g/día)	0	0	100	0	100	0	<b>&lt;0,001</b>
<b>Contenido en cafeína y polifenoles totales</b>							
<b>Dieta ad libitum incluyendo chocolate</b>							
Cafeína (mg/día)	97,77	12,85	104,55	16,3	82	13,43	<b>0,029</b>
Contenido total en polifenoles (mg/día)	2037,53	809,57	2.842	1160,7	2885,2	896,73	<b>0,017</b>
<b>Dieta ad libitum sin chocolate</b>							
Cafeína (mg/día)	97,77	12,85	102,49	16,3	80,33	13,43	<b>0,024</b>
Contenido total en polifenoles (mg/día)	2037,53	809,57	1987,68	1160,69	2030,86	896,73	0,986
(EEM: Error estándar de la media)							

### 3.4 Hambre y apetito por dulce

Este cuestionario, también conocido como Test de Escala Analógica Visual (VAS, Visual Analogic Scale), sirve para abordar diversas facetas del hambre, saciedad y apetito, mediante un conjunto de preguntas estándares (se puede consultar en Anexos). Las voluntarias llevaron a cabo este test en varios momentos del día, y siempre antes y después de cada comida. Los test se completaron los últimos 3 días de cada condición.

El contenido de los test pretende medir a lo largo del día cuanto disfrutarían las participantes comiendo:

- Dulce
- Salado
- Carbohidratos
- Frutas
- Vegetales
- Carne
- Lácteos

El test mide además cuál es la sensación de:

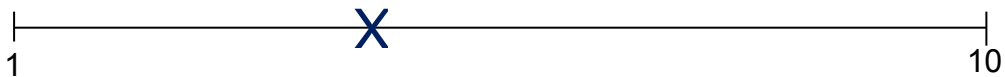
- Hambre
- Sed
- Tener el estómago lleno
- Deseo de comer
- Cantidad que podrían comer
- Náuseas

En total realizaron 8 cuestionarios de hambre y apetito durante la condición de control y mañana, y 10 cuestionarios durante la condición de noche ya que

en esta condición lo repitieron además antes y después de la ingesta de chocolate.

En definitiva completaron un total de 24 pruebas durante la condición de Control y Mañana, y 30 pruebas durante la condición de Noche.

Las puntuaciones del test se evaluaron mediante escalas analógicas visuales de 10 cm.



**Figura 6:** Modelo de escala en la que las voluntarias marcaron sus sensaciones.

Se pidió que las preguntas cubrieran temporalmente desde el momento en que las voluntarias se levantaban hasta el momento en que se acostaban, en el siguiente orden:

- 1) Justo a la hora de levantarse por la mañana
- 2) Justo antes de desayunar (o tomar el chocolate por la mañana) con el desayuno en la mesa
- 3) Con el desayuno recién terminado o recién terminado el chocolate si se trataba de la condición de mañana
- 4) Antes de comer con la comida en la mesa
- 5) Recién terminada de comer
- 6) Antes de cenar con la cena en la mesa
- 7) Recién terminada de cenar
- 8) En la cama antes de dormir
- 9) Justo antes de tomar chocolate en la condición de Noche (EC)
- 10) Justo después de tomar el chocolate (EC)



### **3.5 Calidad y duración del sueño, y frecuencia de la siesta**

Para la determinación de todas las variables relacionadas con el sueño, se llevaron a cabo medidas subjetivas y objetivas.

- Medidas subjetivas: Estos parámetros fueron registrados mediante cuestionarios en los que las voluntarias apuntaron a qué hora se acostaban y a qué hora se levantaban, con el fin de poder correlacionarlo posteriormente con las medidas de temperatura corporal. Registraron la hora de irse a la cama y los tiempos de sueño de forma subjetiva durante los 14 días de cada condición.

- Determinaciones objetivas: Se llevaron a cabo mediante la medición de la temperatura de la muñeca durante los últimos 7 días de cada condición y la actimetría usando un reloj de pulsera. De este modo fue obtenida información sobre las características del sueño (horario, duración y número de despertares), y la frecuencia y duración de la siesta. La duración habitual del sueño (para el sueño nocturno y para la siesta) se calculó utilizando las diferencias entre el tiempo de descanso y los despertares.

### **3.6 Temperatura periférica y actimetría**

La temperatura corporal periférica presenta un ritmo circadiano determinado por la acción combinada de producción y pérdida de calor. La variación de temperatura durante las 24h del día, se utiliza como marcador práctico para evaluar ritmos circadianos y para identificar estudios de cronodisrupción asociada con obesidad y síndrome metabólico.

Este ritmo se caracteriza por un aumento de temperatura mientras se duerme, generalmente por la noche en las mujeres estudiadas, que es consecuencia de una mayor pérdida de calor y vasodilatación en regiones periféricas (lejanas del reloj central).

Durante los últimos 7 días de cada condición, tanto durante la condición de control o sin chocolate (N, Non chocolate); la condición de tomar chocolate por la tarde/noche (EC, Evening Chocolate), y la condición de tomar chocolate por la mañana; Morning Chocolate, MC), las voluntarias usaron en la mano no dominante un reloj de pulsera debidamente adaptado para estas

determinaciones. Este reloj de muñeca tenía integrado dos tipos diferentes de sensores:

1) Sensor de temperatura para determinar los ritmos de temperatura de la muñeca (Thermochron iButton, DS1921H, Dallas, Maxim, Dallas, TX) programado para recopilar información cada 10 minutos. La información almacenada en el iButton se transfirió a través de un adaptador (DS1402D-DR8, Dallas, Maxim) a un ordenador.

2) Sensor acelerómetro (G Acceleration Data Logger UA-004-64; Onset Computer, Bourne, MA, 169 USA) el cual mide la actividad física y los ritmos de posición corporal, y está programado para registrar datos cada 30 segundos. La información almacenada en el actímetro se transfirió a través de un adaptador óptico USB (MAN-BASE-U-4, HOBO, Onset Computer) a un ordenador utilizando el software proporcionado por el fabricante (HOBOWare v. 2,2). A partir de la información proporcionada por el actímetro se definieron dos variables: actividad motora (A) y posición corporal (P). En primer lugar, la actividad se calculó como grados de cambio en la posición de los ejes X, Y y Z con respecto al tiempo de muestreo anterior, como se describe por Ortiz-Tudela *et al.* (131). En segundo lugar, la posición se calculó como el ángulo entre el eje X del actímetro y el plano horizontal, siendo el valor 0° cuando el brazo estaba en posición horizontal y 90° cuando estaba vertical.

Con el fin de disminuir el enmascaramiento que produce la temperatura ambiental, el estudio se realizó entre octubre y abril, evitando las temperaturas ambientales extremas típicas del sur de España en verano.

### **3.7 Variable integradora TAP (Temperatura, Actividad y Posición) y sueño**

Las medidas de la temperatura periférica, actividad motora y posición del cuerpo fueron finalmente integradas en una variable llamada TAP validada por Ortiz-Tudela *et al.* (131).

Para calcular la variable integradora TAP, primero se normalizaron las variables de temperatura, actividad y posición calculando los percentiles 95 y 5 para cada variable. Los valores de temperatura periférica se invirtieron ya que

los valores de actividad y posición eran opuestos, de modo que los valores máximos para las tres variables concurren a la misma hora del día. Después se calculó la media de las 3 variables normalizadas, donde 0 correspondía al reposo y sueño, y 1 a actividad en movimiento. Más tarde se calculó un umbral individualizado a partir de la distribución de frecuencias del TAP, para el análisis individualizado de los patrones de sueño. Se calificó como sueño cuando TAP estaba por debajo de un umbral predeterminado, previamente validado por polisomnografía (186). El tiempo en movimiento, fue definido como el tiempo en que se detectó un movimiento en cualquiera de los tres ejes, y se utilizó para discriminar entre los estados de sueño y vigilia.

Para caracterizar las variables de temperatura, actividad, posición y TAP, calculamos sus parámetros usando métodos paramétricos y no paramétricos:

- a) Se aplicó el análisis de Cosinor para calcular: mínimo; mesor, amplitud, acrofase, porcentaje de ritmicidad y rayleigh (ver glosario).
- b) Se realizaron análisis no paramétricos para calcular: estabilidad interdiaria, variabilidad intradía y amplitud relativa. El índice de función circadiana (CFI) se calculó como el promedio de estos tres parámetros (ver glosario). M5 y su hora (TM5) y M10 y su hora (TM10) también fueron calculados.

Todos los parámetros rítmicos se obtuvieron utilizando un paquete integrado para análisis de series temporales Kronowizard (<https://kronowizard.um.es/kronowizard>) (Laboratorio de Cronobiología, Universidad de Murcia, España, 2015). Estos datos se procesaron para eliminar mediciones erróneas, como las producidas por la eliminación temporal del sensor en el momento de la ducha.

### **3.7 Calorimetría indirecta**

Para la realización de esta prueba, las participantes estuvieron en una sala de calorimetría indirecta en un entorno clínico y permanecieron allí en posición

sedentaria, en las siguientes condiciones controladas de temperatura 23°C y de humedad relativa  $52 \pm 2\%$ .

La calorimetría indirecta (Oxicon Pro/Delta, VIASYS Healthcare, Germany) se realizó con las participantes en estado de relajación, sentadas en un sillón reclinable y después de 30 minutos de reposo inicial, en ayunas y a la misma hora de la mañana en todas las condiciones (N, EC, MC).

Se utilizó una campana de plástico (Oxycon Pro/Delta, VIASYS Healthcare, Germany) para capturar el intercambio de gases. Se alentó a las mujeres a guardar silencio y respirar normalmente durante todo el tiempo que conlleva la realización de la prueba (20 minutos), se midió el consumo de oxígeno ( $O_2$ ) (mL/min) y la producción de dióxido de carbono ( $CO_2$ ) (mL/min). A partir de estas determinaciones, se calculó el cociente respiratorio (CR). Los valores de gasto de energía ( $kcal\ min^{-1}$ ) se calcularon de acuerdo con la ecuación de Weir. La oxidación de carbohidratos (CHO;  $g\ min^{-1}$ ) y de grasas (F;  $g\ min^{-1}$ ) se calcularon a partir del CR y se determinó también el porcentaje de energía total.

### **3.8 Determinación de cortisol y melatonina salival**

La melatonina y el cortisol salival son de las variables de referencia más frecuentes para estimar los ritmos circadianos de los individuos, junto con la temperatura, ya que ambas hormonas tienen un ritmo circadiano muy marcado (34).

El cortisol, es una hormona corticosteroide producida en la zona fasciculada de la corteza suprarrenal, con valores decrecientes a lo largo del día, un periodo nocturno de quiescencia y un fuerte aumento en la segunda mitad de la noche. El pico máximo de concentración se sitúa en el momento de levantarse, y el pico mínimo se alcanza aproximadamente dos horas después de comenzar el sueño (187).

La melatonina se conoce como la <<hormona de la oscuridad>>, ya que su síntesis es inhibida por la presencia de luz y estimulada por la ausencia de ésta. Por ello, la melatonina alcanza su pico máximo en mitad de la noche,

cayendo a continuación durante la otra mitad de la noche. Además de estar influenciada por la presencia de luz, su síntesis también depende del sueño y de la privación del mismo (188).

La saliva para las mediciones de cortisol y melatonina se recogió el día 13 de cada condición usando salivetes (Sarstedt, Barcelona, España). En el caso del cortisol las muestras fueron recolectadas antes del desayuno (9:00 h), antes de la comida (14:00 h) y antes de la cena (21:00 h). Los salivetes se envolvieron en papel de aluminio y se conservaron en la nevera a una temperatura de alrededor de 4°C, hasta su entrega el día siguiente. Dichos salivetes se centrifugaron para la obtención de la saliva, la cual se repartió en alícuotas de 500 µl en criotubos para su posterior congelación y almacenamiento a -80°C hasta su análisis. Las concentraciones salivales de cortisol se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA) (IZASA, Barcelona, España).

En el caso de la melatonina las muestras se recogieron antes de la comida (14:00 h) y de madrugada (01:30 h). Los salivetes se envolvieron también en papel de aluminio y se conservaron en la nevera a una temperatura de alrededor de 4°C hasta su entrega. Las muestras de saliva se centrifugaron y se repartieron en alícuotas de 500 µl en criotubos para su posterior congelación y almacenamiento a -80°C hasta su análisis. Las concentraciones de melatonina salival se midieron mediante radioinmunoensayo (RIA) (IBL, Alemania).

### **3.9 Glucemia basal y postprandial**

Las medidas de concentración de glucosa en sangre en ayunas (glucosa basal) se determinaron el último día de cada condición con un Gluco-Men® LX Plus+ (Menarini diagnósticos S.A. Barcelona, España) que utiliza tiras reactivas para medir la glucosa.

Para la determinación de los valores de glucosa postprandial se utilizó el mismo dispositivo después de haber comido 100 g de chocolate. Se realizó una curva de glucosa con medidas cada 30 minutos durante 2 horas.

### 3.10 Microbiota

Las voluntarias recolectaron una muestra de heces al comienzo y al final de cada condición, (día 1 y día 13 respectivamente). Muestras que se conservaron congeladas hasta el momento de su análisis.

Las muestras se recogieron por la mañana en todas las condiciones y aproximadamente a la misma hora.

#### 3.10.1 Análisis de la composición de la microbiota

Este análisis se realizó por secuenciación de amplicón 16S rRNA. El ADN fecal total se aisló utilizando el Kit de purificación de ADN y ARN completo MasterPure (Epicenter, Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones indicadas por el fabricante, con algunas modificaciones que incluyeron un paso de batido y la incubación de enzimas para aumentar la extracción de ADN (189).

La concentración total de ADN se midió usando un fluorómetro Qubit® 2.0 (Life Technology, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se normalizó a 5 ng/μL para la amplificación del gen 16S rRNA (región V3-V4) usando el kit Nextera XT Index.

Los amplicones se verificaron con un chip Bioanalyzer DNA 1000 y las bibliotecas se secuenciaron usando un ciclo de 2x300pb en pares (MiSeq Reagent kit v3) en una plataforma MiSeq-Illumina (Valencia, España).

Los controles durante la extracción de ADN y la amplificación por PCR también se incluyeron y secuenciaron. Se realizó un método de selección OTU de referencia abierta que utiliza el 97% de identidad con la base de datos Greengenes 13\_8 utilizando la tubería QIIME (versión 1.9.0). Singletons y OTU con una frecuencia relativa inferior a 0,01 fueron eliminados. Se eliminaron también las secuencias que no pudieron clasificarse a nivel de dominio, o clasificadas como cianobacterias, cloroplastos y rizobiales. Se obtuvieron abundancias relativas de bacterias específicas, así como índices de diversidad alfa (Chao1: riqueza y Shannon: diversidad).

### 3.10.2 Análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC)

El protocolo utilizado para determinar los AGCC en muestras de heces fue adaptado (190) con algunas modificaciones. Brevemente, las muestras de heces se mezclaron con NaOH 1N en una proporción de 1:1 (p/v) y se liofilizaron durante 48h. Se homogeneizaron 100 mg de muestra liofilizada en un vórtice con una mezcla de ácido fórmico (20%), metanol y ácido 2-etilbutírico (patrón interno, 2 mg/ml en metanol) (1 / 4,5 / 1 v/v), expuesto a ultrasonidos durante 5 minutos y centrifugado a 16.110 g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante obtenido se filtró (13 mm, 0,22 PTFE, VWR International, EE. UU.) Y se analizó por GC-FID.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando un sistema GC Agilent 7890A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un inyector automático 7683B (Agilent Technologies, EE. UU).

Se usó una columna capilar de sílice fundida Nukol TM (Supelco, EE. UU) de 30 m × 0,25 mm de diámetro interno, recubierta de 0,25 µm para separar diferentes ácidos grasos de cadena corta. Se suministró helio como gas portador a una velocidad de flujo de 25 ml/min. La temperatura inicial del horno fue de 80°C y se mantuvo constante durante 5 minutos y luego se elevó a 185°C a una velocidad de 5°C/min. Se inyectaron muestras (2 µL) con una temperatura de puerto de inyección de 220°C. Los caudales de hidrógeno y aire como gas de reposición fueron de 30 y 400 ml/min, respectivamente. La temperatura del FID fue de 220°C y el tiempo de ejecución para cada análisis fue de 26 min.

Los AGCC se identificaron en comparación con los tiempos de retención de estándares auténticos (Supelco, EE. UU). La cuantificación se basó en curvas de calibración construidas para un conjunto de estándares AGCC (ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido valérico, ácido isocaproico, ácido caproico y ácido heptanoico).

La concentración expresada como mmol/mg de heces (peso fresco) de cada ácido graso de cadena corta se calculó utilizando ecuaciones de

regresión lineal ( $R^2= 0,99$ ) a partir de las curvas de estándares correspondientes.

En la figura que se muestra a continuación (**Figura 7A y B**) se representa un cronograma de todas las determinaciones realizadas y del día en que se realizaron cada una de ellas para cada condición del experimento y para el período de baseline.



Días	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<b>P:</b> Peso	P							P						P
<b>I:</b> Impedancia (porcentaje de grasa) y circunferencia de cintura y cadera														I
<b>RD and DS:</b> Registro Dietético y Diario de Sueño 14-días de autoregistro y captura de fotografías de las comida	RD & DS													
<b>TEV:</b> Test de Escala Visual												TEV	TEV	TEV
<b>T and A:</b> Temperatura y actividad (reloj), medidas objetivas de sueño y siesta								T&A						
<b>C:</b> Calorimetría														C
<b>CT:</b> Cortisol (8:00h,14:00h, 21:00h )													CT	
<b>G:</b> Glucosa														G
<b>H:</b> Heces	H1												H2	

**Figura 7A:** Muestra un cronograma, durante los 14 días de cada condición, de las determinaciones realizadas.

Días	1	2	3	4	5	6	7
<b>P:</b> Peso	P						
<b>I:</b> Impedancia (porcentaje de grasa) y circunferencia de cintura y cadera	I						
<b>RD and DS:</b> Registro Dietético y Diario de Sueño 14-días de autoregistro y captura de fotografías de las comida	RD & DS						
<b>TEV:</b> Test de Escala Visual				TEV	TEV	TEV	
<b>T and A:</b> Temperatura y actividad (reloj), medidas objetivas de sueño y siesta	T&A						
<b>C:</b> Calorimetría	C						
<b>CT:</b> Cortisol (8:00h,14:00h, 21:00h )						CT	
<b>G:</b> Glucosa	G						
<b>H:</b> Heces	H1						

**Figura 7B:** Muestra un cronograma, durante los 7 días de baseline, de las determinaciones realizadas.

## 4. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

### 4.1 Análisis comparativo entre las tres condiciones del estudio

Con el fin de evaluar las diferencias estadísticas entre las tres condiciones de estudio, se realizó un análisis de medidas repetidas (ANOVA) entre tomar chocolate por la mañana, por la tarde/noche y no tomar chocolate, y se realizó una comparación *post hoc* con análisis de mínima diferencia significativa (DMS), los análisis se realizaron con los valores finales de cada condición. La normalidad de los datos fue comprobada por los test de Shapiro-Wilk y por Kolmogorov- Smirnov (se consideró distribución normal cuando  $P > 0,05$ ).

Para los datos antropométricos, las comparaciones se realizaron al inicio del experimento o durante cada condición (inicio y final del período de dos semanas). Los análisis de glucosa en ayunas se ajustaron por edad y peso corporal inicial.

Para eliminar la posible influencia del contenido de cafeína de otros componentes de la dieta (que diferían entre las condiciones, véase Tabla 10) ajustamos el contenido de cafeína para los diferentes resultados, y se mantuvieron las diferencias significativas para todos los casos excepto para la circunferencia de cintura que perdió la significación, aunque se mantuvo la misma tendencia ( $P = 0,053$ ).

### 4.2 Microbiota

Para determinar las posibles diferencias entre las tres condiciones entre los grupos bacterianos o su función se realizó inicialmente un análisis de medidas repetidas (ANOVA). Posteriormente este análisis se ajustó por la muestra fecal del primer día de la primera condición de cada voluntaria (ANCOVA). Para obtener información adicional sobre las relaciones entre los grupos bacterianos y los AGCC, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), utilizando rotación Varimax normalizada.

### 4.3 Poder estadístico

Aceptando un riesgo  $\alpha$  de 0,05 en una prueba bilateral, para el tamaño de muestra actual ( $n= 19$ ), nos queríamos asegurar de poder detectar cualquier cambio de peso sustancial en el prototipo de estudio. Para el peso corporal total tuvimos un poder estadístico de 80,48%, 84,84%, 97,3%, para detectar 1kg de cambio de peso dentro de cada condición (chocolate mañana, noche y control respectivamente).

Para los resultados de las principales variables de interés en este estudio, probamos si teníamos suficiente poder estadístico para detectar cambios significativos: para la circunferencia de cintura teníamos un poder de 70,99%, 93,99% y 90,66%, para detectar 2 cm de cambio dentro de cada condición. Para las variables de glucosa en ayunas, y oxidación de lípidos y carbohidratos, tuvimos un poder estadístico de 70,42%, 75,98% y 63,73% respectivamente para detectar cambios del 4,7%, 34,55% y 17,86% entre las condiciones de mañana y noche.

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS 20.0 (SPSS, IBM, Madrid, España). Un valor de  $P$  de  $<0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 5. BÚQUEDA BIBLIOGRÁFICA

Para el desarrollo del presente trabajo hemos realizado una revisión sistemática sobre el tema objeto de estudio siguiendo los principios del método científico.

Mediante esta revisión tratamos de dar respuesta a nuestra hipótesis inicial en la que nos preguntábamos sobre los diferentes efectos que produce el chocolate según el momento de la ingesta sea por la mañana o por la noche.

La revisión se inició con una búsqueda exhaustiva de la literatura publicada en PubMed (U.S. National Library of Medicine). El acceso se realiza a través de Internet en la dirección URL [www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed) que accede a revistas con índice de impacto en el área en que se incluye la presente tesis: chocolate, fisiología, metabolismo, cronobiología, menopausia, etc.

La búsqueda se realizó utilizando los siguientes términos y se ajustó a los 10 últimos años:

Obesity OR Appetite Depressants OR Body Weight. Diet, Reducing OR Skinfold Thickness OR Lipectomy OR Abdominal Obesities OR Obesities OR Abdominal OR Abdominal Obesity OR Central Obesity, OR Central Obesities OR Obesities, Central OR Obesity, Central, OR Obesity, Visceral OR Visceral Obesity OR Obesities, OR Visceral OR Visceral Obesities Agents OR Weight-Loss OR Weight Loss Agents OR Management, Obesity OR Managements, Obesity OR Obesity Managements OR Obesity Management Systems OR Management System, Obesity OR Management Systems, Obesity OR Obesity Management System OR System, Obesity Management OR Systems, Obesity Management OR Loss, Weight OR Losses, Weight OR Weight Losses OR Weight Reduction OR Reduction, Weight OR Reductions, Weight OR Weight Reductions OR Body Weights OR Weight, Body OR Weights, Body OR Program, Weight Reduction OR Programs, Weight Reduction OR Reduction Program, Weight OR Reduction Programs, Weight OR Weight Reduction Program OR Weight Loss Programs OR Loss Program, Weight OR Loss Programs, Weight OR Program, Weight Loss OR Programs, Weight Loss OR Weight Loss Program OR Diets, Reducing OR Reducing Diet OR Reducing Diets OR Weight Reduction Diet OR Diet, Weight Reduction OR Diets, Weight Reduction OR Weight Reduction Diets OR Weight Loss Diet OR Diet, Weight Loss OR Diets, Weight Loss OR Weight Loss Diets OR Gain, Weight OR Gains, Weight OR Weight Gains.

Obtuvimos 815 artículos. Y tras acotar la búsqueda especificando solo para estudios en humanos, los artículos resultantes fueron 507.

Revisamos todos los artículos con el fin de comprobar que existiera coherencia entre el tema de los mismos y la pregunta que nos hacíamos, y que

el diseño de los estudios fuera adecuado, se eliminaron 113 artículos por diversos motivos (véase **Tabla 11**).

**Tabla 11. Criterios de exclusión de artículos científicos.**

Número de artículos	Criterios Exclusión
54	No habla de chocolate
9	Chocolate y otras enfermedades
2	Chocolate y contenido en aluminio
2	Sustitutos del chocolate
28	El chocolate es una covariable
3	Composición molecular del chocolate
3	Como influye el olfato sobre el deseo de chocolate y las expectativas de comerlo sobre los deseos
2	Chocolate, tensión arterial y factores aterogénicos
1	Historia del chocolate
2	Chocolate en diabetes
1	Predictores neuronales de chocolate
1	Consumo de chocolate y daño en el ADN
2	Efectos de polifenoles en el genoma y en la mejora de la inflamación típica de la obesidad
1	Efectos de suplementos de cacao sobre el LDL
1	Efectos de prohibir el chocolate
1	El ejercicio disminuye el apetito por chocolate

Finalmente se revisó un total de 394 artículos.

# RESULTADOS

---





## **1. Resultados objetivo 1**

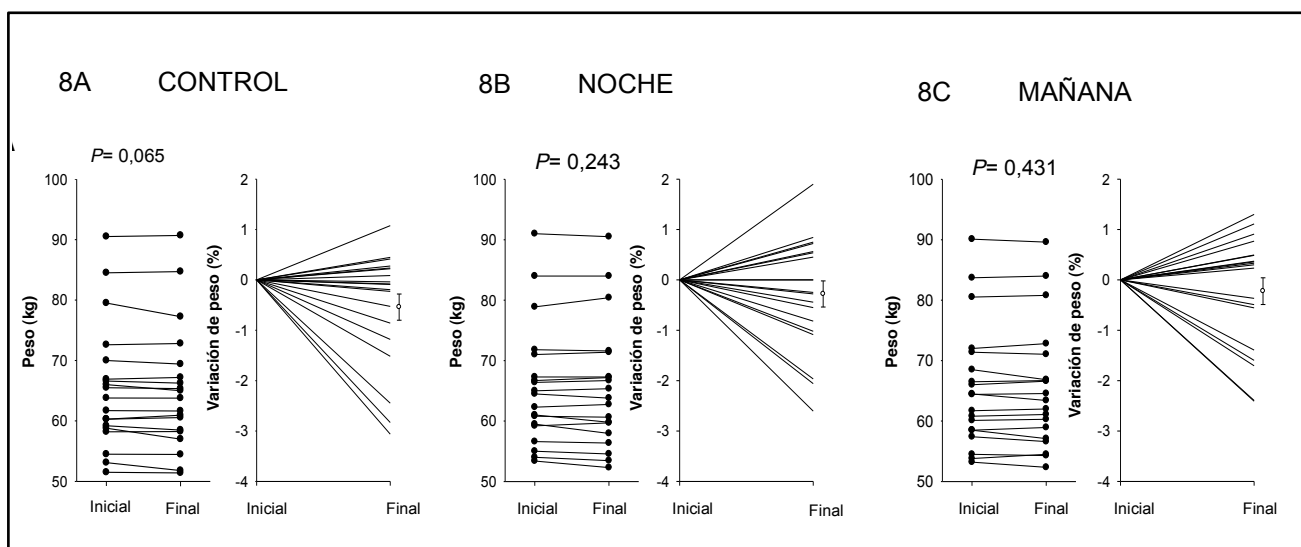
---

Efectos de la ingesta de chocolate sobre el peso corporal y otras medidas antropométricas



Como resultado de este trabajo para el objetivo 1, y en contra de lo esperado, no se han encontrado diferencias significativas en cuanto al peso corporal de las voluntarias a pesar de que las participantes tomaban 100 g de chocolate con leche cada día durante las dos intervenciones del experimento con chocolate (chocolate mañana y chocolate noche) (véase **Figura 8**). Respecto a la circunferencia de cintura tampoco encontramos diferencias significativas ( $P > 0,05$ ).

Sabemos que el chocolate con leche es un alimento de gran densidad calórica. Su ingesta supone un extra de 542 kcal/día durante los 14 días de duración de cada condición con chocolate. Sin embargo, a pesar de estas calorías adicionales consumidas con el chocolate, y que las participantes continuaban con su dieta habitual *ad libitum*, no hubo diferencias significativas en lo que a la ganancia de peso se refiere (**Figura 8**;  $P > 0,05$ ).



**Figura 8 (A, B, C):** Cambios en el peso corporal en cada condición del experimento (control, noche y mañana). Peso corporal en kg de cada mujer (panel izquierdo) y porcentajes de cambio (panel derecho).

**Resultados en relación al objetivo 1:** nuestros resultados muestran que la ingesta de 100 g de chocolate con leche, por mujeres postmenopáusicas, en un

espacio de tiempo limitado (1 h) y durante un período corto de dos semanas, no afecta a la pérdida de peso corporal.

## **2. Resultados objetivo 2**

---

Posibles mecanismos de ausencia de aumento de peso tras la ingesta de chocolate



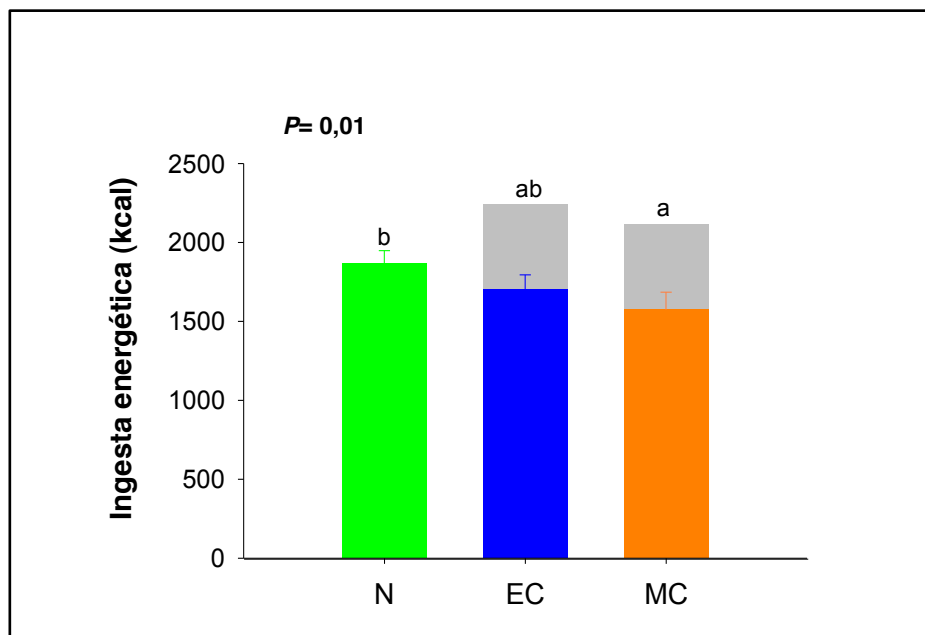
Para investigar el motivo por el cual las voluntarias no ganaron peso corporal, hemos explorado diferentes aspectos relacionados con la ingesta y el gasto energético.

### **1. La ingesta de energía *ad libitum* se redujo con el chocolate**

Como hemos explicado anteriormente las voluntarias podían continuar durante la intervención con su dieta habitual, y no se les dio ninguna recomendación sobre lo que debían comer, salvo en lo que se refiere al chocolate. A pesar de ello, hemos comprobado que la ingesta de energía *ad libitum* se redujo de forma significativa al tomar chocolate.

**Este resultado coincide con la reducción observada en el hambre, el apetito y el deseo de dulces reportada por las participantes mediante el VAS.**

La **Figura 9A** representa la ingesta de energía diaria *ad libitum* en las tres condiciones (mañana, noche y control). Las voluntarias redujeron espontáneamente en un 16% ( $296 \pm 442$  kcal/d) su consumo de energía *ad libitum* al tomar chocolate por la mañana ( $P= 0,01$ ) y, en menor medida al tomar el chocolate por la noche, condición en la que la disminución fue del 10% ( $165 \pm 404$  kcal/d) (una tendencia  $P= 0,09$ ). Como era de esperar, aquellas mujeres que ganaron menos peso tomando chocolate durante los 14 días de la condición de noche, fueron las que compensaron mejor la ingesta calórica ( $r=0,64$ ;  $P= 0,004$ ).



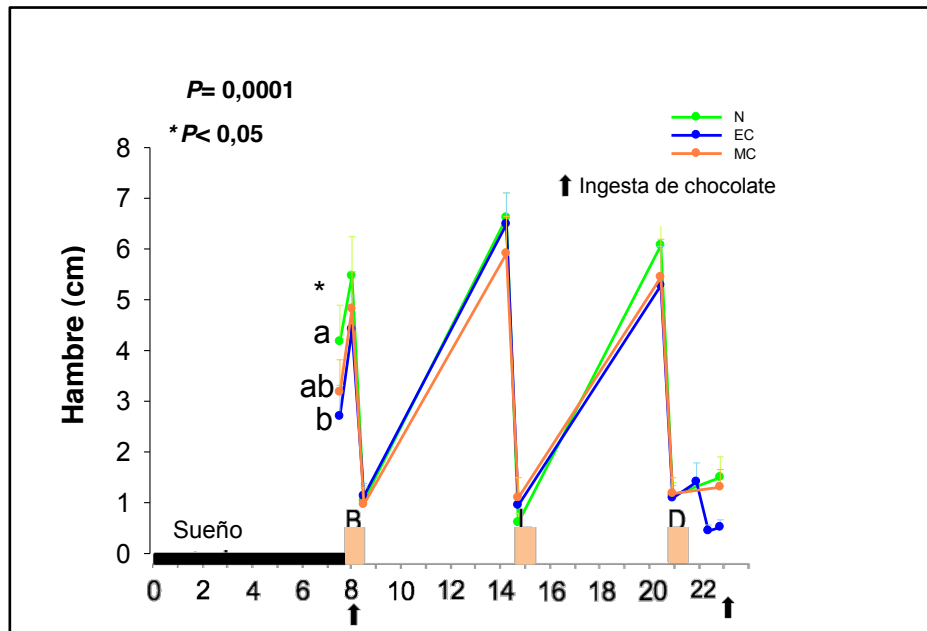
**Figura 9A:** Diferencias de energía *ad libitum* entre las condiciones sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC). Las barras de color representan el promedio de la ingesta de energía diaria *ad libitum* durante las dos semanas de cada condición del experimento. Las barras grises representan la ingesta extra de energía del chocolate (542 kcal; 33% de la ingesta diaria promedio de energía habitual). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.

Al tomar chocolate por la mañana, las voluntarias disminuyeron su consumo de energía *ad libitum* al reducir la grasa (de 17 a 7 g/d) y los carbohidratos (de 27 a 17 g/d) comparado con control ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en cuanto a las proteínas ( $P > 0,05$ ). Estos resultados coinciden con la ingesta adicional de macronutrientes del chocolate con leche que es rica en grasas (31 g) y carbohidratos (58 g), y baja en proteínas (6 g). Así pues, las mujeres compensaron el 53% de los carbohidratos aportados por el chocolate y, en menor medida (45%) la grasa aportada por el chocolate ( $P < 0,05$ ).

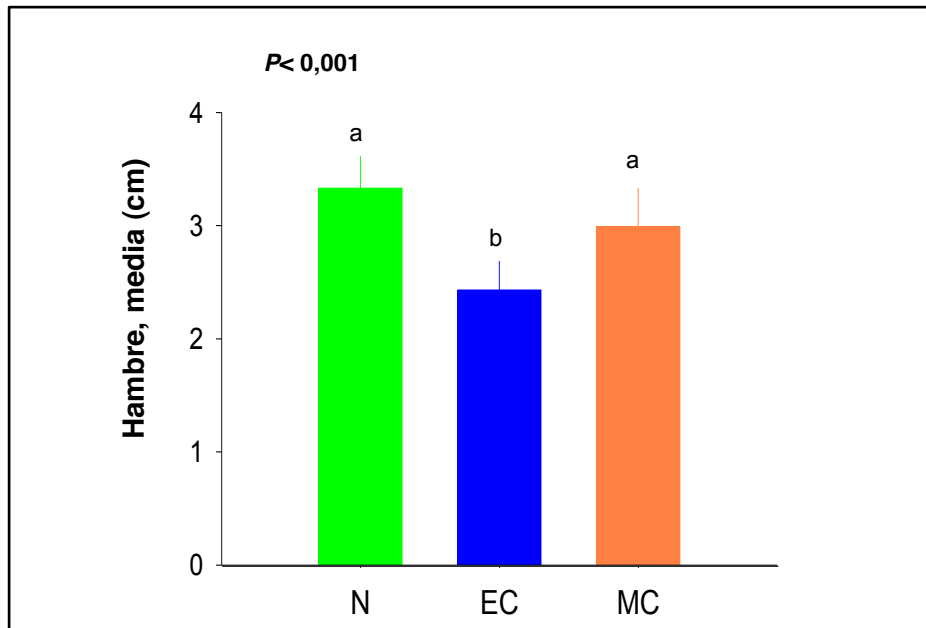
Otro resultado observado es que cuando tomaban chocolate, las voluntarias manifestaron tener menos hambre y menos deseo de dulce que



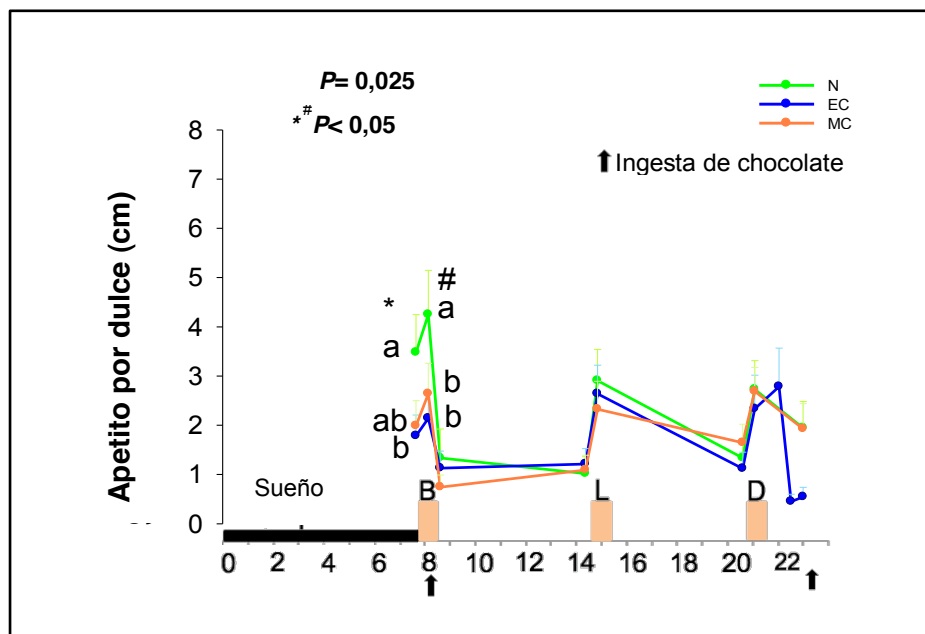
cuando no lo tomaban, especialmente cuando tomaban el chocolate en la condición de noche **Figura 9 (B, C, D, E)**.



**Figura 9B:** Representa las diferencias entre las condiciones sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC). La sensación de hambre es resultado del VAS realizado en diferentes momentos del día: el punto 1º que se representa antes de las 8 de la mañana se refiere a justo en el momento de levantarse; el punto siguiente o 2º) Justo antes de desayunar (antes de tomar el chocolate); 3º) Recién terminado de desayunar; 4º) Antes de comer; 5º) Recién terminado de comer; 6º) Antes de cenar; 7º) Recién terminado de cenar; 8º) En la cama antes de dormir; 9º) Justo antes de tomar el chocolate en la condición de noche; 10º) Justo después del chocolate. (B: desayuno; L: comida; D: cena). Diferentes letras (a, b c) indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.

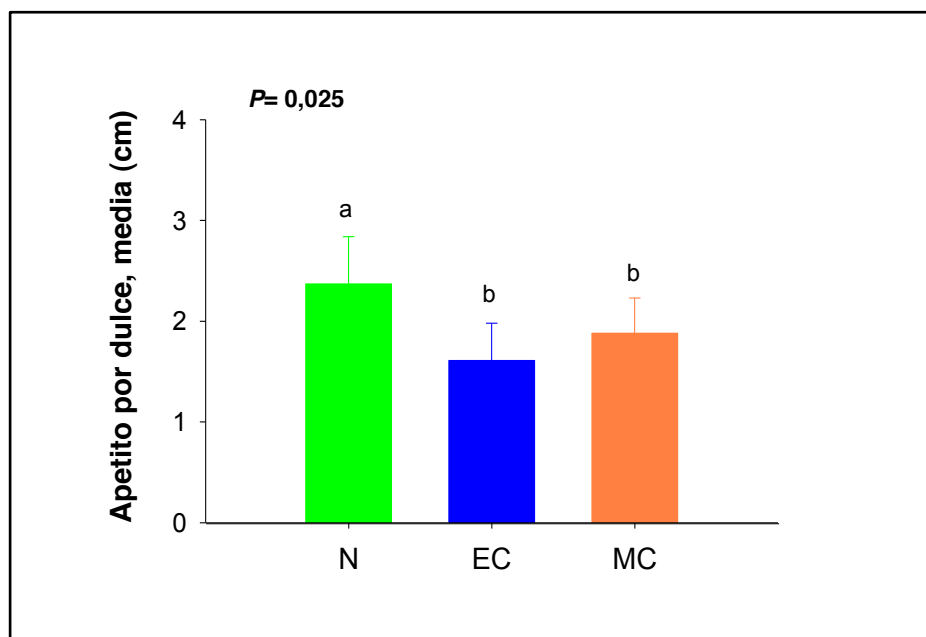


**Figura 9C:** Representa los valores promedio de la variable hambre en las tres condiciones (sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC)). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.



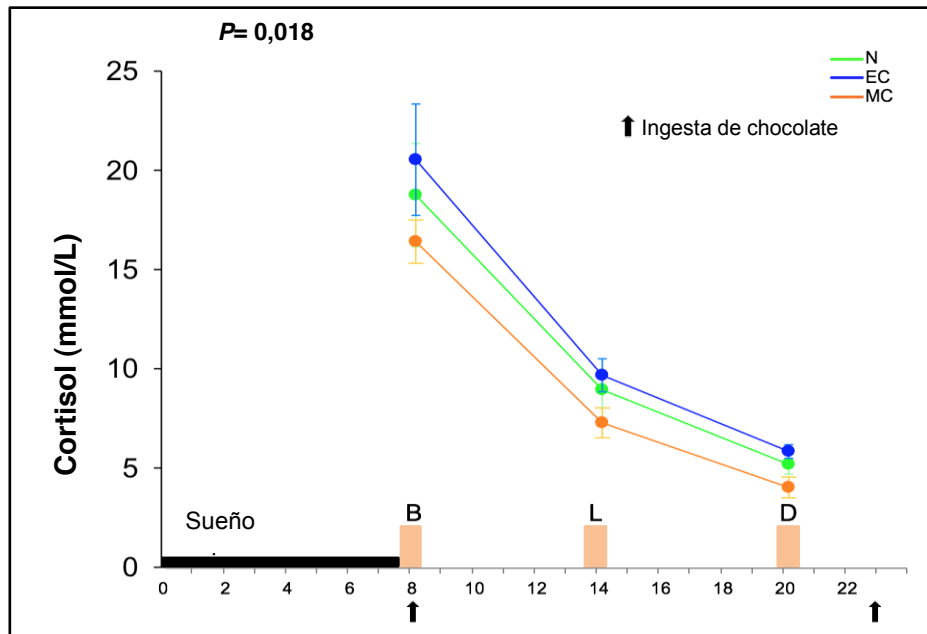
**Figura 9D:** Representan las diferencias entre las condiciones sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC). La sensación de apetito por dulce es resultado del VAS realizado en diferentes momentos del día: el punto 1º que se

representa antes de las 8 de la mañana se refiere a justo en el momento de levantarse; el punto siguiente o 2º) Justo antes de desayunar (antes de tomar el chocolate); 3º) Recién terminado de desayunar; 4º) Antes de comer; 5º) Recién terminado de comer; 6º) Antes de cenar; 7º) Recién terminado de cenar; 8º) En la cama antes de dormir; 9º) Justo antes de tomar el chocolate en la condición de noche; 10º) Justo después del chocolate. (B: desayuno; L: comida; D: cena). Diferentes letras (a, b c) indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.

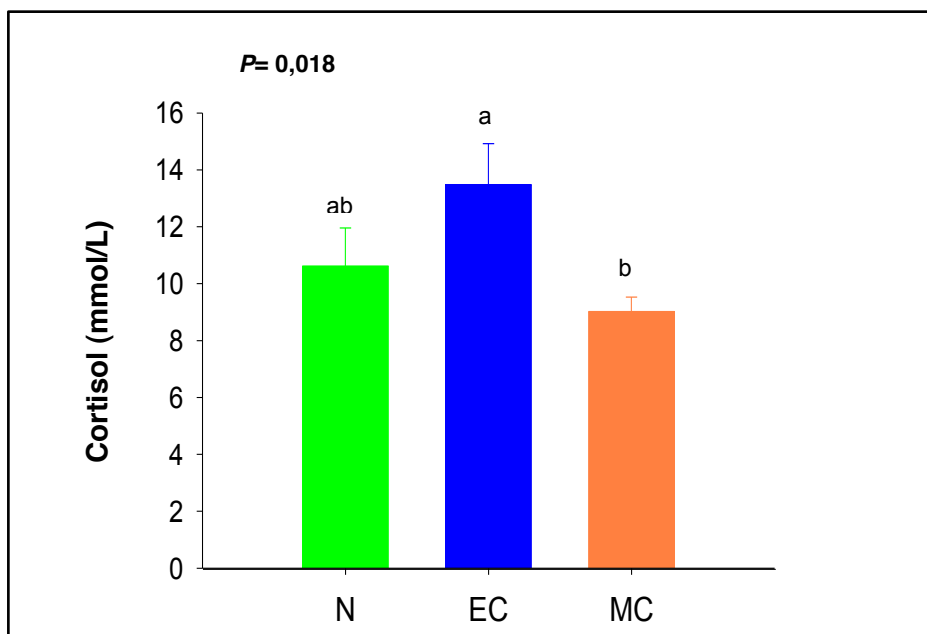


**Figura 9E:** Representa los valores promedio de la variable hambre y apetito por dulce en las tres condiciones (sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC)). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.

Nuestros resultados muestran además que los valores diarios de cortisol fueron significativamente más bajos al tomar chocolate en la condición de mañana que en la de tarde/noche (**Figura 9F, 9G**).



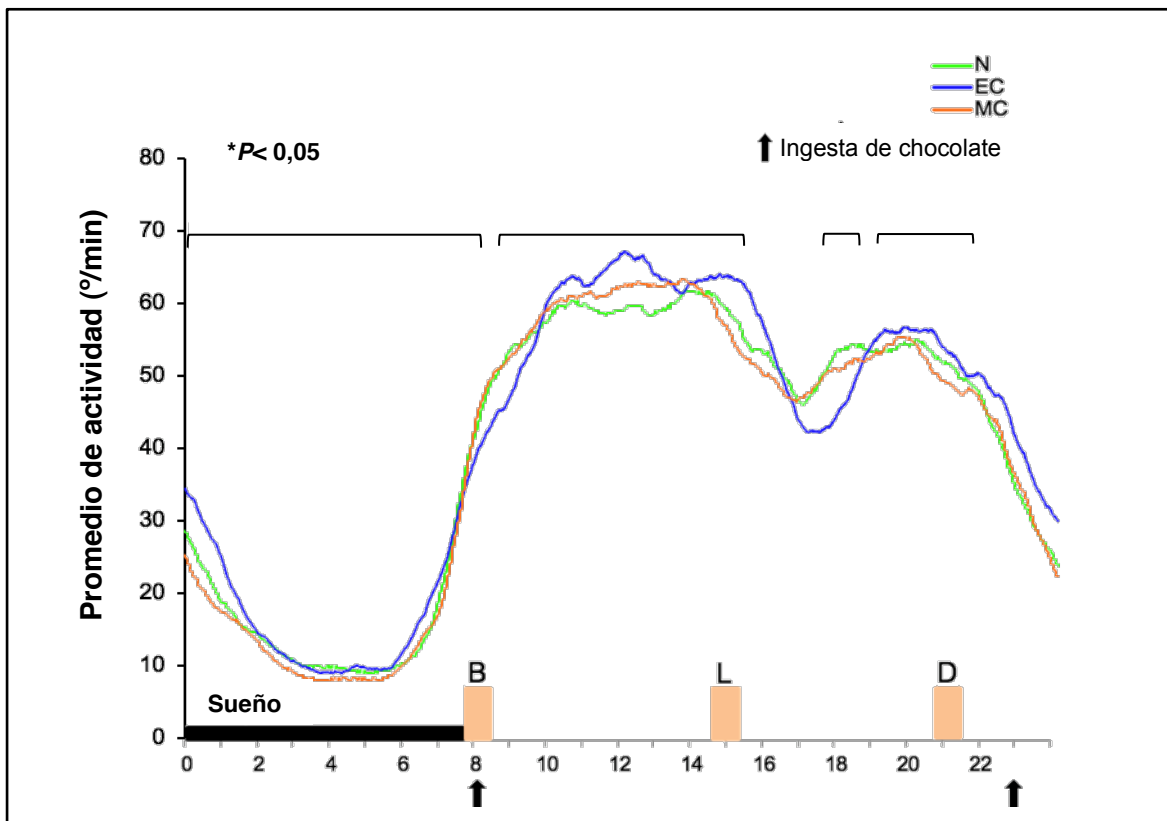
**Figura 9F:** Representa los cambios en los valores de cortisol entre las condiciones sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC). (B: desayuno; L: comida; D: cena). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras realizar el test de comparación por pares.



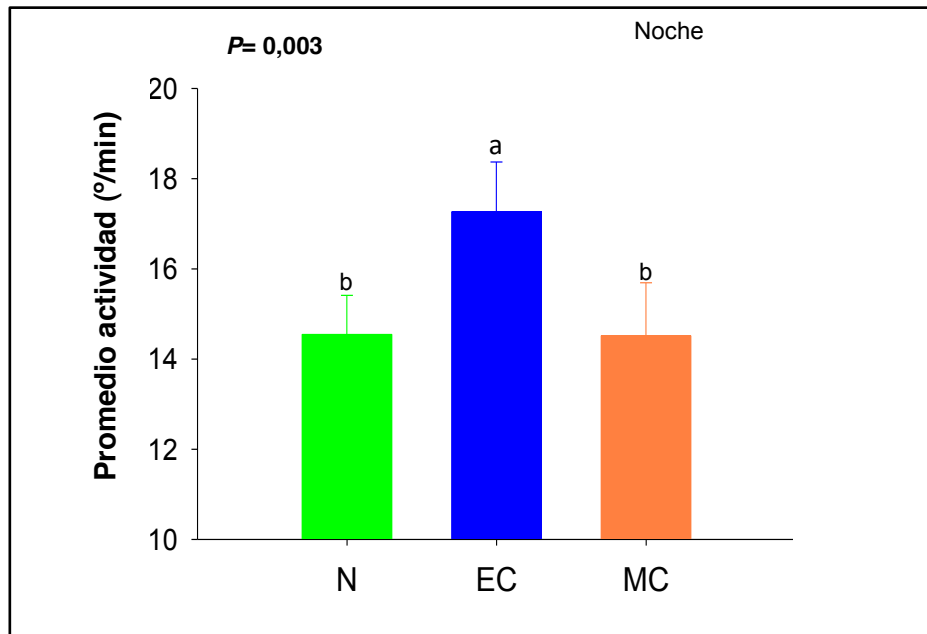
**Figura 9G:** Representa los valores promedio de cortisol en las tres condiciones del estudio (sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC)). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras realizar el test de comparación por pares.

## 2. El gasto de energía se incrementó a través de una mayor actividad y disipación de calor

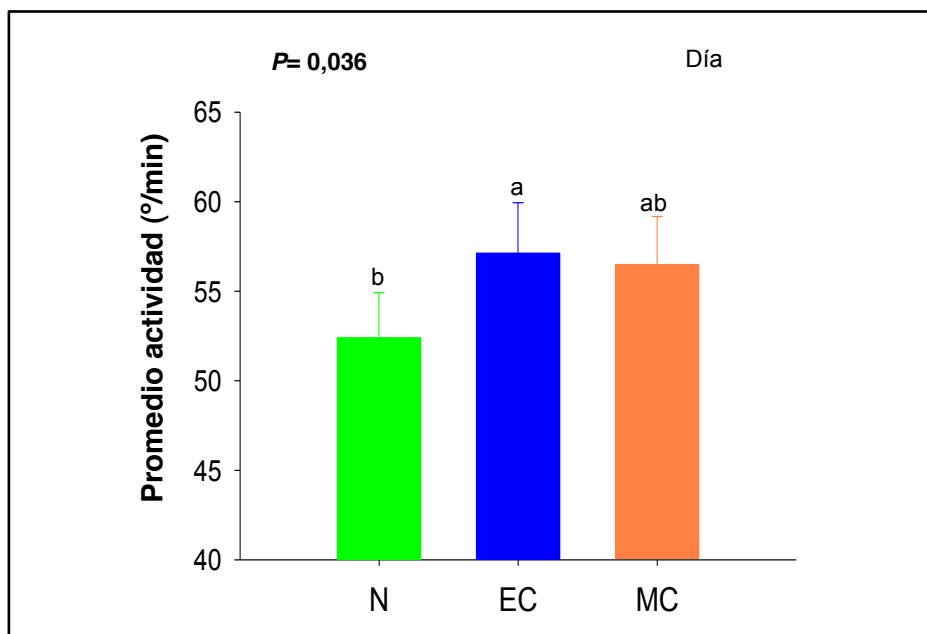
Nuestros resultados mostraron un aumento en la actividad física de las participantes. Este aumento fue del 6,9% al consumir chocolate en la condición de noche en comparación con la condición de control ( $42,3 \pm 1,9$  %/min;  $39,6 \pm 1,8$  %/min;  $P= 0,001$ ). Las diferencias en el promedio de la actividad física fueron significativas durante el tiempo de la noche y el día **Figura 10 (A, B, C)**.



**Figura 10A:** Representa los valores de actividad física registrados por actimetría en la condición sin chocolate (N), chocolate noche (EC) y chocolate mañana (MC). Los corchetes indican los intervalos de tiempo donde se observaron diferencias significativas en el análisis estadístico por muestras repetidas ANOVA (ANOVA rm),  $*P<0,05$ . (B: desayuno L: comida; D: cena).

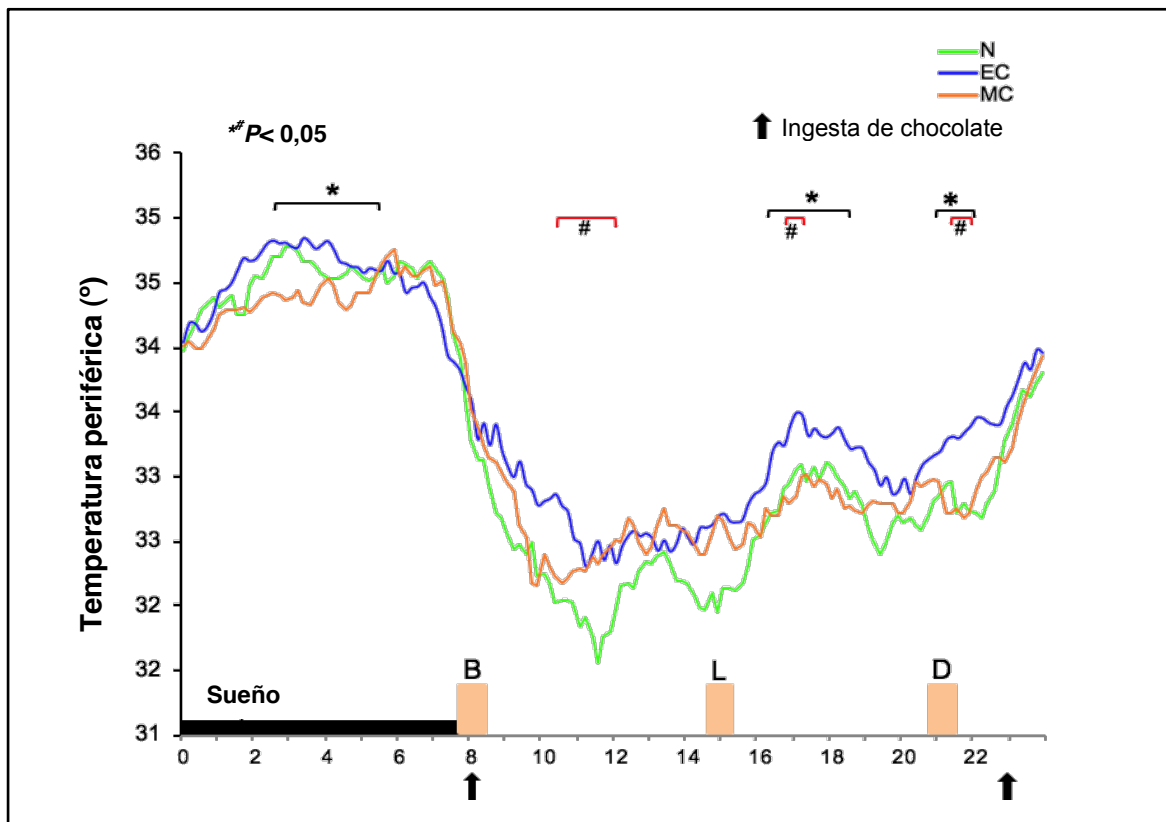


**Figura 10B:** Muestra las diferencias en el promedio de actividad física entre las diferentes condiciones durante la noche (de 00:00 a 08:00h). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.

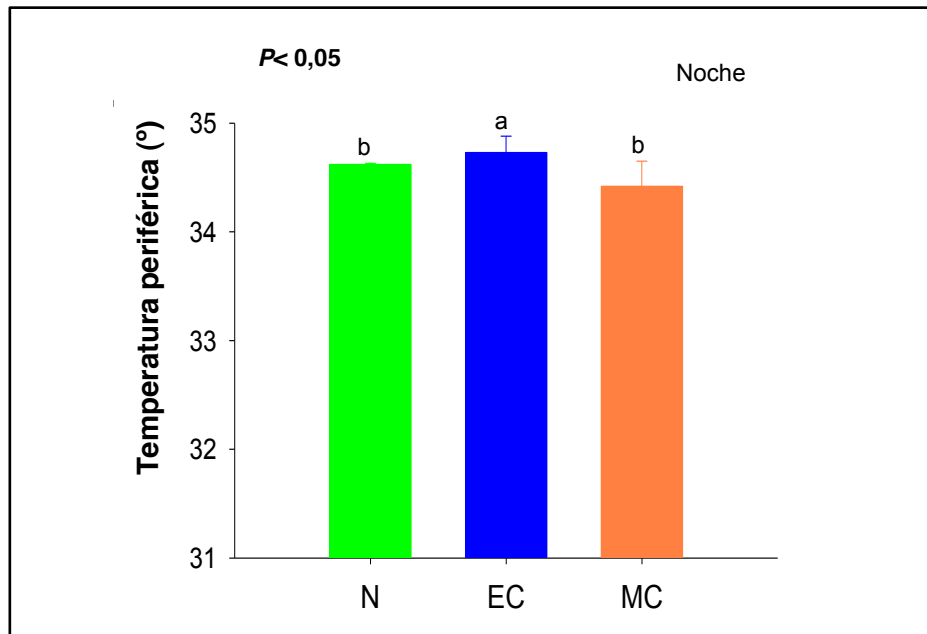


**Figura 10C:** Muestra las diferencias en el promedio de actividad física entre las diferentes condiciones durante el día (08:00 h a las 20:00 h). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.

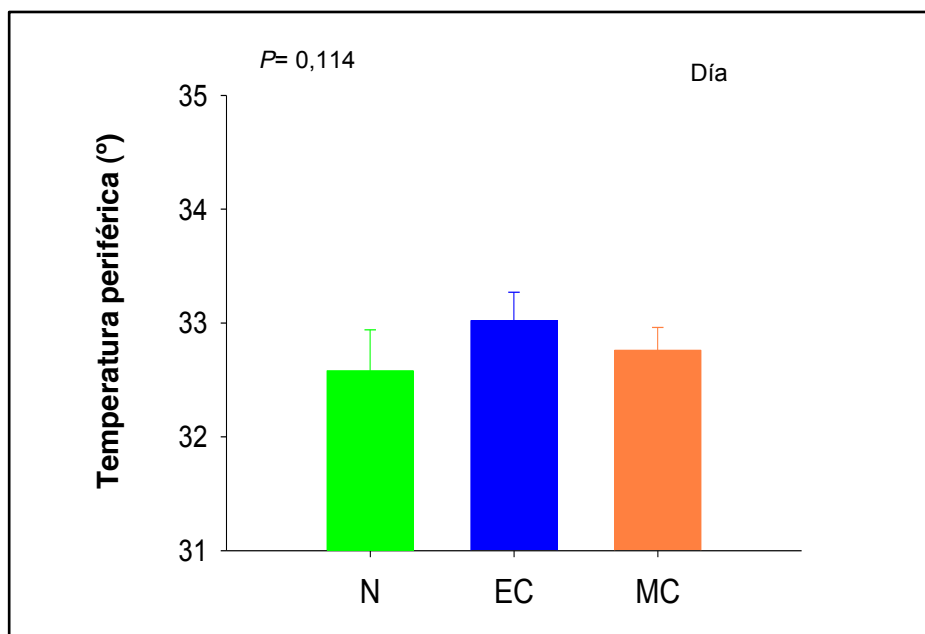
Además, las mujeres experimentaron una mayor disipación de calor mientras comían chocolate en la condición de noche que cuando no comían chocolate, esta diferencia fue significativa en periodos específicos durante el día, en la mañana (desde las 10:00 h a las 12:00 h), en el período postprandial después del almuerzo (desde las 16:00 h a las 19:00 h) y después de cenar (desde las 21:00 h a las 22:00 h) **Figura 10 (D, E, F)** aunque no se encontraron diferencias significativas con el promedio del día.



**Figura 10D:** Representa la disipación de calor de la piel de los registros de temperatura periférica en las tres condiciones, los corchetes indican los intervalos de tiempo en los que se observan diferencias significativas por análisis de muestras repetidas ANOVA (ANOVA rm) con  $P < 0,05$ . (B: Desayuno, L: Comida, D: Cena). \* Representa diferencias significativas entre las condiciones de mañana (MC) y noche (EC). # Representa diferencias significativas entre las condiciones de noche (EC) y control (N).



**Figura 10E:** Diferencias en la temperatura promedio entre las diferentes condiciones (sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC)) durante el tiempo de la noche (de 00:00 h a 05:00 h). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.



**Figura 10F:** Diferencias en la temperatura promedio entre las diferentes condiciones (sin chocolate (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC)) durante el día (08:00 h a 20:00 h). Diferentes letras indican diferencias significativas entre condiciones tras el test de comparación por pares.



### 3. Efectos en las variables relacionadas con el sueño y los ritmos circadianos tras la ingesta de chocolate.

Los resultados obtenidos en cuanto a la temperatura periférica están representados en mapas de calor (**Figura 16**, apartado Discusión). Estos resultados mostraron que todas las participantes mantuvieron un ritmo diario de temperatura durante el día y la noche, con valores elevados durante la fase de sueño. No se observaron cambios, al ingerir chocolate en la condición de mañana o de noche en comparación con *baseline*.

Sin embargo, al observar visualmente estos mapas de calor la figura muestra una mayor regularidad de los episodios de sueño en la condición de noche, así como una menor variabilidad en el inicio del sueño durante los días entre semana en comparación con la condición de mañana (60 min vs. 78 min).

Cuando se analizaron las variables circadianas de fragmentación del sueño o variabilidad circadiana, nuestros resultados mostraron que esta era mayor cuando el chocolate se tomaba en la condición de noche (Variabilidad intradiaria;  $IV= 0,18 \pm 0,17$ ) que en la condición de mañana ( $IV= 0,14 \pm 0,16$ ) o en la de control ( $IV= 0,15 \pm 0,14$ ). Sin embargo no encontramos diferencias significativas entre condiciones ( $P= 0,086$ ). No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las otras variables circadianas como son la amplitud relativa ( $P= 0,529$ ), la hora de las cinco horas de máxima temperatura (TM5) ( $P= 0,089$ ), o el Índice de Funcionalidad Circadiana (TCIF) ( $P= 0,896$ ).

Si bien no se observaron cambios en la duración del sueño nocturno en función del momento de ingesta del chocolate, según la evaluación objetiva tomar chocolate por la mañana se asoció con una mayor frecuencia de siesta en comparación con la condición de control ( $4 \pm 0,49$  d/semana;  $1 \pm 0,21$  d/semana  $P= 0,019$ ) mientras que no hubo diferencia significativa entre tomar chocolate en la condición de noche y la de control ( $P= 0,082$ ).

**Resultados en relación al objetivo 2:** los resultados del experimento muestran que las voluntarias redujeron voluntariamente la ingesta de energía *ad libitum* al tomar chocolate. Esta reducción fue de un 16% en la condición de mañana (MC) lo cual coincide con valores más bajos de cortisol.

En cuanto al gasto energético, se observó un aumento de la actividad física y de la disipación de calor en la condición de noche (EC).

Los resultados obtenidos respecto al sueño reflejan que todas las participantes mantuvieron un ritmo diario de temperatura día y noche, con valores altos durante la fase de sueño independientemente de si tomaban el chocolate en la condición de mañana o noche en comparación con *baseline*. No se encontraron diferencias significativas en la duración del sueño nocturno. En lo que se refiere a la siesta, tomar chocolate por la mañana se asoció con una mayor frecuencia de siesta en comparación con la condición de control.

### **3. Resultados objetivo 3**

---

Diferentes efectos metabólicos del chocolate según el momento de la ingesta

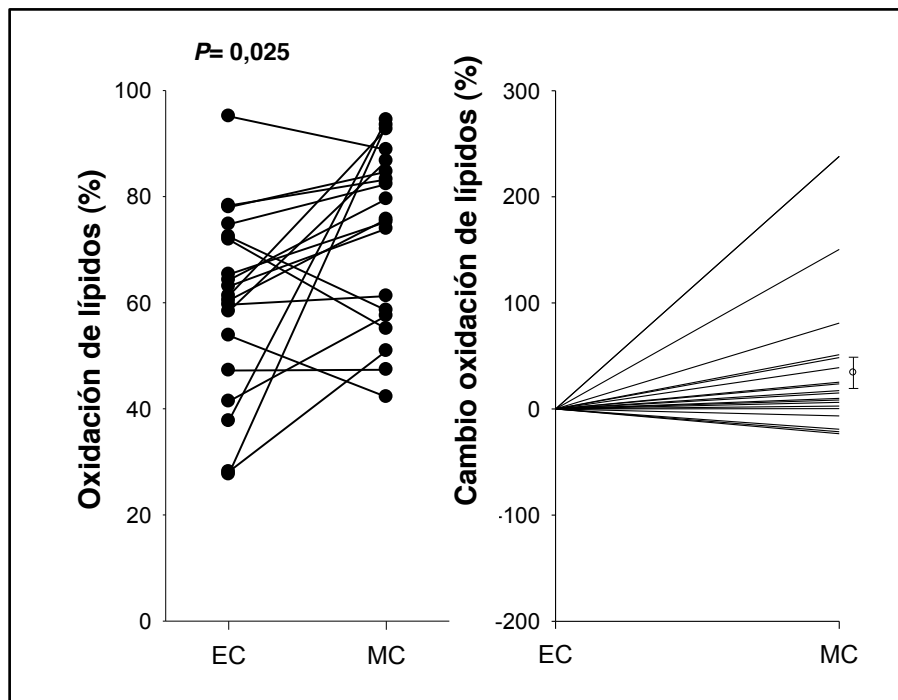


El chocolate tuvo diferentes efectos metabólicos según el momento de la ingesta.

### Efecto del chocolate sobre la oxidación de sustratos

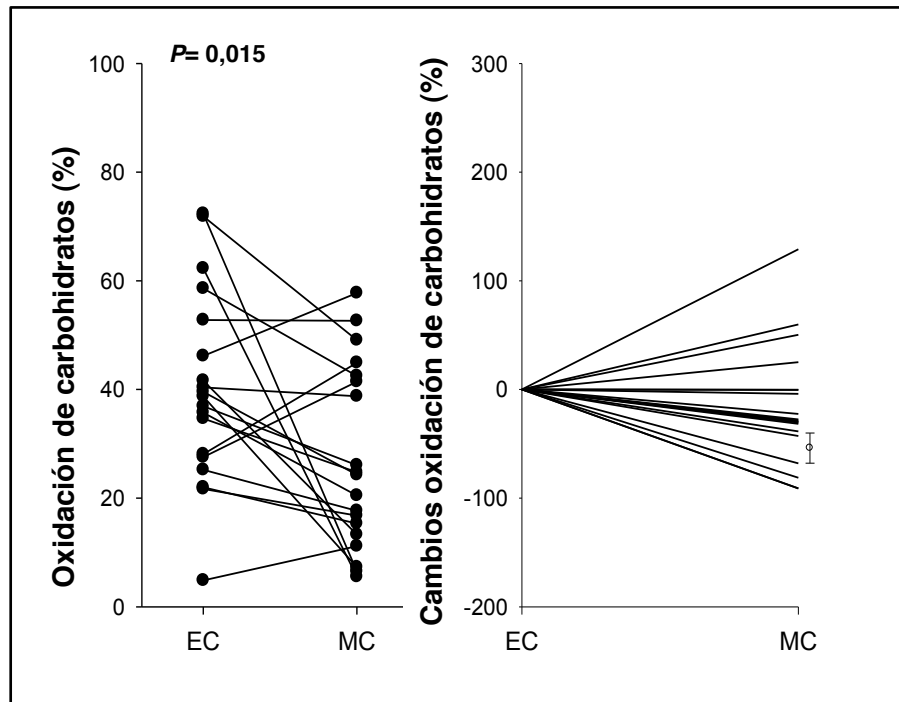
Los resultados obtenidos muestran que el chocolate en la condición de mañana dio lugar a una oxidación preferente de lípidos mientras que el chocolate en la condición de noche dio lugar a un cambio de sustrato siendo los carbohidratos, el sustrato más utilizado para la oxidación.

Exactamente, tomar chocolate por la mañana dio lugar a un incremento de la oxidación de lípidos del orden de un 25,60% más respecto a tomarlo por la noche (**Figura 11A**).



**Figura 11A:** Efectos metabólicos del chocolate sobre la oxidación lipídica según el momento de la ingesta. El gráfico de la izquierda muestra valores absolutos en cada mujer y el de la derecha el porcentaje de cambio en la oxidación lipídica.

Por el contrario, la ingesta de chocolate en la condición de noche indujo preferentemente la oxidación de carbohidratos en un 35,33% más respecto al chocolate por la mañana (**Figura 11B**).



**Figura 11B:** Efectos metabólicos del chocolate sobre la oxidación de carbohidratos según el momento de la ingesta. El gráfico de la izquierda representa valores absolutos en cada mujer y el de la derecha el porcentaje de cambio en la oxidación de hidratos de carbono.

No encontramos diferencias significativas en cuanto a la oxidación de sustratos entre noche y control, mientras que estas diferencias fueron significativas entre las condiciones de mañana y control tanto para lípidos como para carbohidratos.

En lo que se refiere a la tasa metabólica basal, nuestros resultados indican que no se encontraron diferencias significativas comparando entre las tres condiciones objeto de estudio.

**Resultados en relación al objetivo 3:** nuestros resultados muestran que el chocolate provoca diferentes efectos metabólicos según el momento de la ingesta. Concretamente, se observa que la ingesta de chocolate en la condición de mañana induce preferentemente la oxidación de lípidos mientras que tomarlo en la condición de noche induce la oxidación de carbohidratos.

#### **4. Resultados objetivo 4**

---

Posibles efectos del chocolate sobre la glucemia según el momento de la ingesta



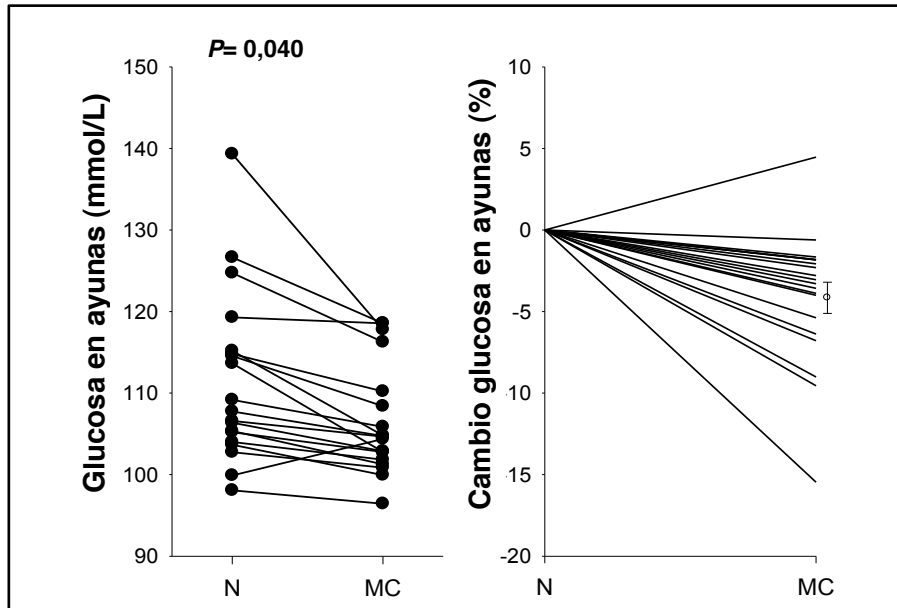


Considerando los resultados obtenidos sobre los valores de glucosa en sangre, podemos concluir que el chocolate en la condición de mañana disminuyó los valores de glucemia en ayunas.

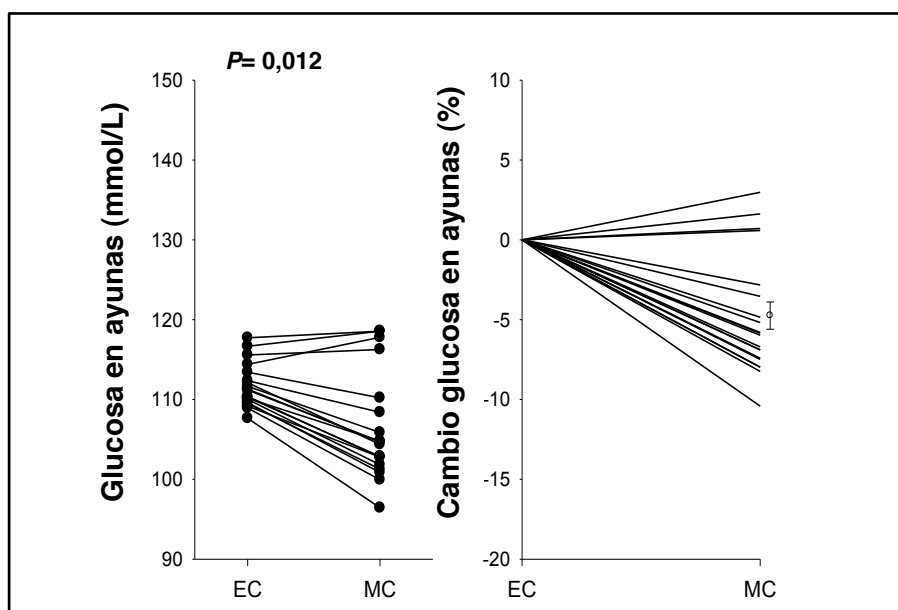
Nuestros resultados indican que la reducción de la glucosa en ayunas es -4,4% en la condición de mañana respecto a la condición de control (**Figura 12A**), mientras que la ingesta de chocolate en la condición de noche mostró un incremento significativo (+4,9%) de los valores de glucemia comparado con el chocolate en la mañana (**Figura 12B**).

Se realizó además, la determinación de la glucemia postprandial, tras la ingesta de 100 g de chocolate, en las tres condiciones objeto de estudio. Llevamos a cabo una curva de glucosa tras la ingesta de chocolate, con determinaciones cada 30 minutos durante 2 horas, no encontramos diferencias significativas en las determinaciones obtenidas (30 minutos ( $P= 0,861$ ), 60 minutos ( $P= 0,480$ ) 90 minutos ( $P= 0,107$ ) y a los 120 minutos ( $P= 0,420$ )) (**Figura 12C**).

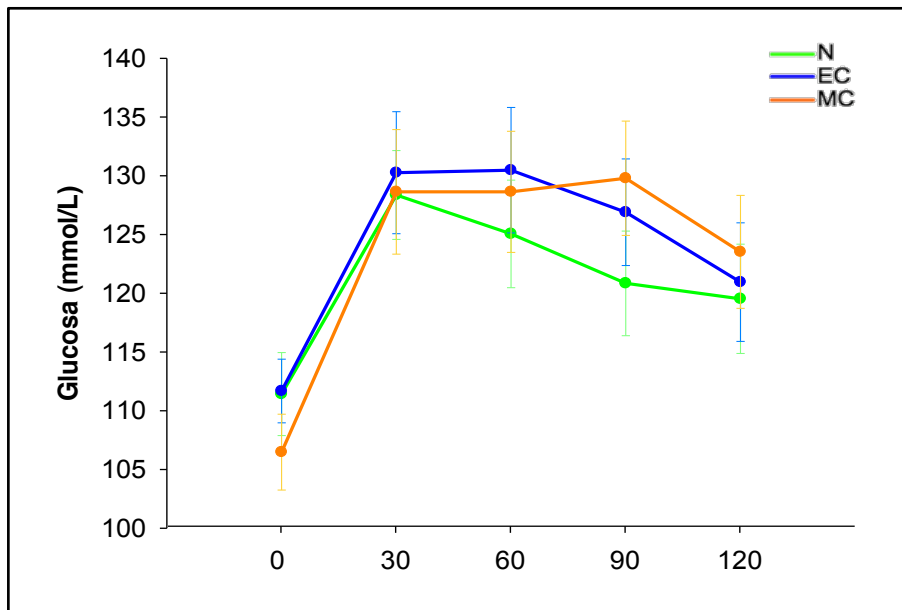
Al calcular el Área Bajo la Curva (AUC) de los valores de glucosa obtuvimos un valor significativamente mayor en la condición de chocolate por la mañana (**Figura 12D**).



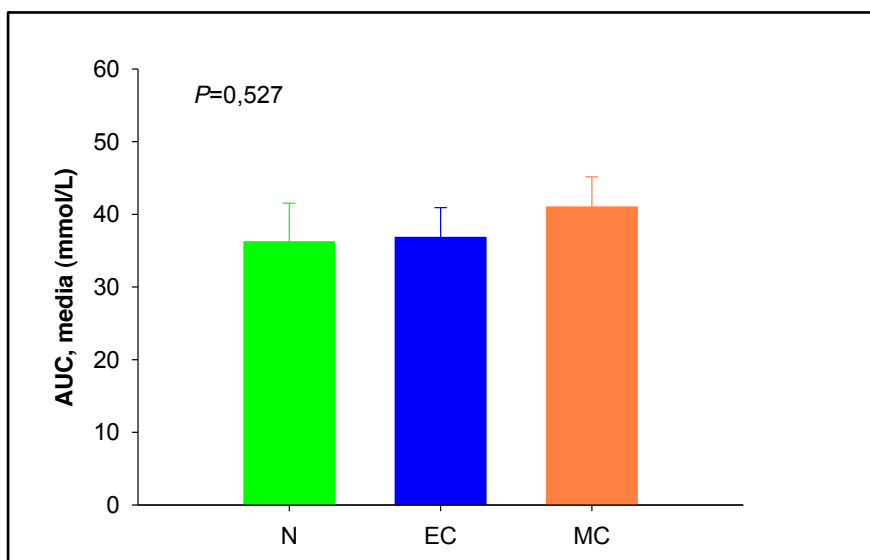
**Figura 12C:** Efectos del chocolate sobre la glucosa basal en la condición de control (N) y la condición de mañana (MC). El gráfico de la izquierda representa valores absolutos para cada participante y el de la derecha el porcentaje de cambio en los valores de glucosa.



**Figura 12D:** Efectos del chocolate sobre la glucosa basal en la condición de noche (EC) y en la de mañana (MC). El gráfico de la izquierda representa valores absolutos en cada mujer y el de la derecha porcentaje de cambio en los valores de glucosa.



**Figura 12C:** Representa los valores de glucemia postprandial tras la ingesta de 100 g de chocolate con leche. Las determinaciones se realizaron al inicio y a los 30, 60, 90 y 120 minutos de la ingesta del chocolate.



**Figura 12D:** Representa los valores medios del área bajo la curva de glucemia en las tres condiciones del experimento (Control (N), chocolate noche (EC), chocolate mañana (MC)).

-  
-

**Resultados en relación al objetivo 4:** nuestros resultados muestran que la ingesta de chocolate en la condición de mañana, durante la primera hora al levantarse, disminuyó la glucemia basal. No encontramos diferencias significativas en la glucosa postprandial realizada durante dos horas tras la ingesta de chocolate

## **5. Resultados objetivo 5**

---

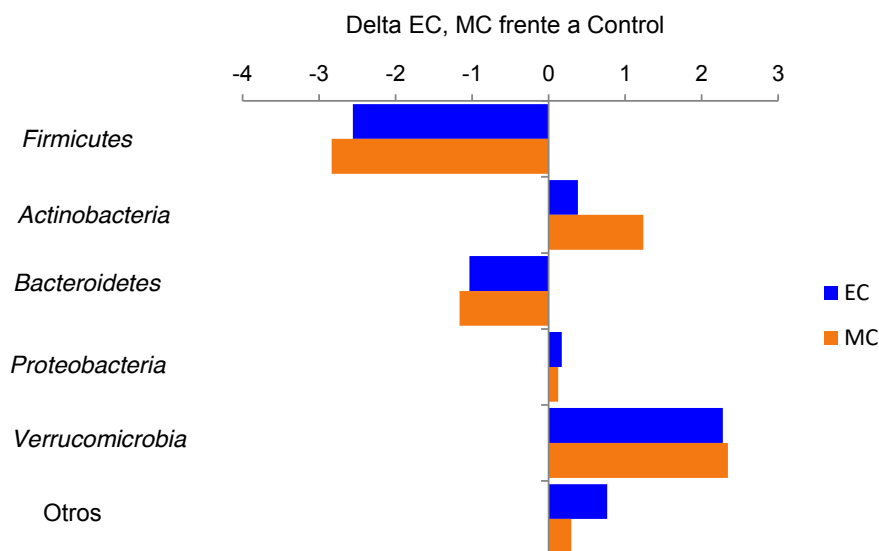
Cambios en la composición y función de la microbiota intestinal con la ingesta de chocolate



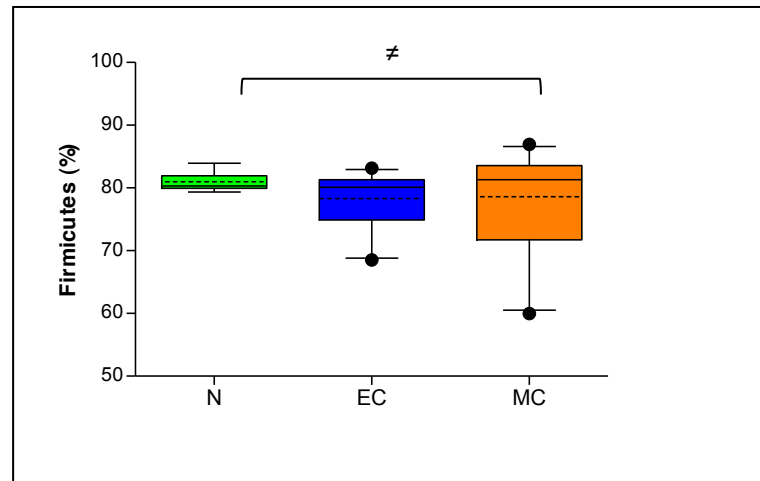
### 1. En cuanto a la composición de la microbiota

Nuestro estudio mostró que la ingesta de chocolate dio lugar a cambios en la composición de la microbiota (**Figura 13A**), una disminución de la diversidad de la microbiota calculada mediante el Índice de Simpson inverso (una tendencia,  $P= 0,082$ ) y un aumento significativo en la variabilidad interindividual en comparación con la condición de control (no chocolate) en la mayoría de los géneros y especies estudiados.

Así, nuestros resultados tras la ingesta de chocolate con leche tanto cuando lo tomaban por la mañana como cuando lo tomaban por la noche en comparación con la condición en la que no tomaban chocolate, mostraron una reducción en la abundancia relativa de *Firmicutes* ( $P= 0,003$ ) (Figura 13A, **Figura 13B**).

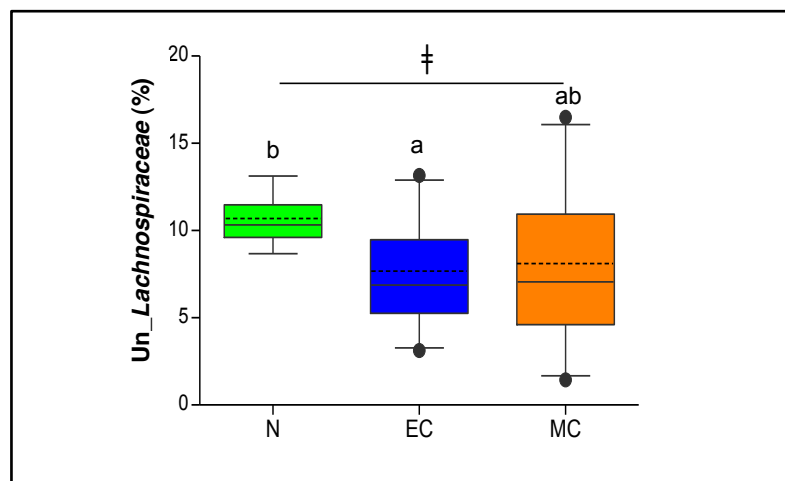


**Figura 13A:** Diferencias en los *phylum* predominantes en la microbiota tras la condición de noche (EC) y mañana (MC) comparados con la condición de Control. (Esta figura representa valores, no diferencias significativas)



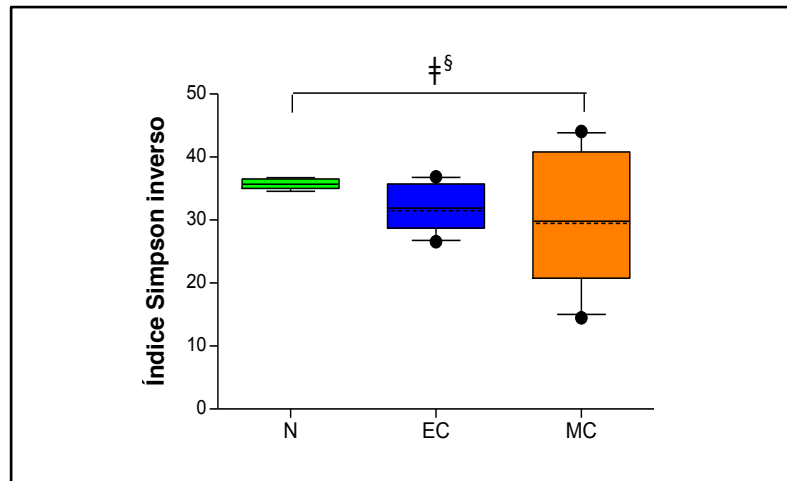
**Figura 13B:** Cambios en la abundancia relativa (%) de *Firmicutes* entre las tres condiciones del estudio (N, EC, MC). ‡ Representa  $P < 0,05$ , en este caso ( $P = 0,003$ ).

Más específicamente hubo una reducción en el género *Lachnospiraceae* ( $P = 0,014$ ) (**Figura 13C**) y una reducción en la diversidad microbiana calculada mediante el Índice de Simpson inverso en donde se observó una tendencia ( $P = 0,082$ ) (**Figura 13D**).



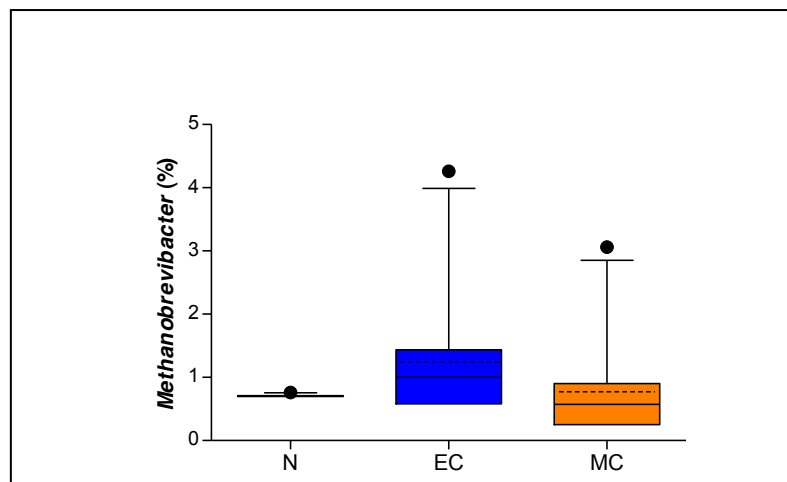
**Figura 13C:** Cambios en la abundancia relativa (%) de *Lachnospiraceae* entre las tres condiciones del estudio (N, EC, MC). ‡ representa  $P < 0,05$ .





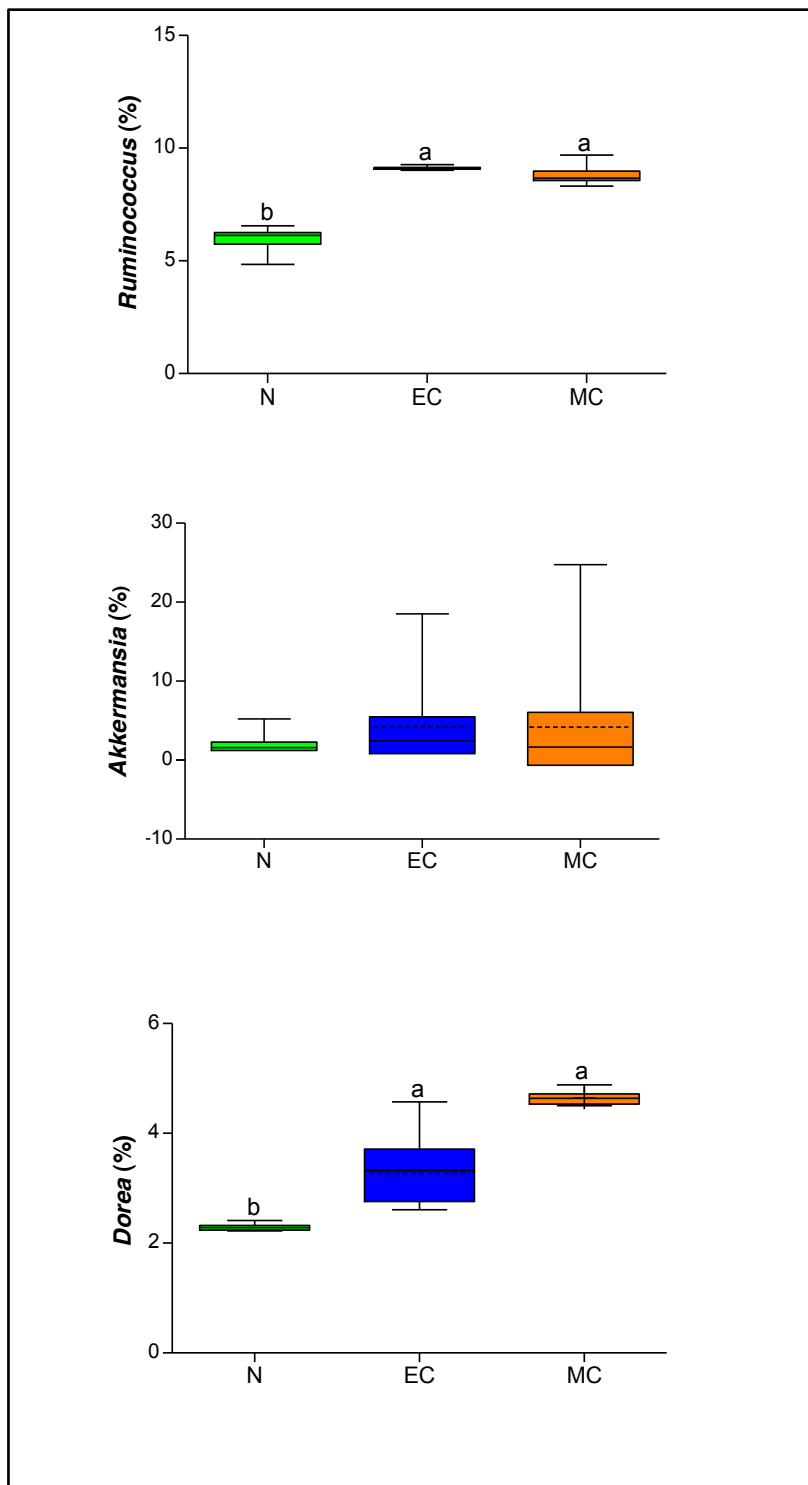
**Figura 13D:** Indica la diversidad microbiana entre las tres condiciones, medida como el Índice de Simpson inverso. ‡§ representa una tendencia  $P \leq 0,09$  ( $P = 0,082$ ).

No apreciamos diferencias significativas en la abundancia del género *Methanobrevibacter* tras la ingesta de chocolate (**Figure 13E**).

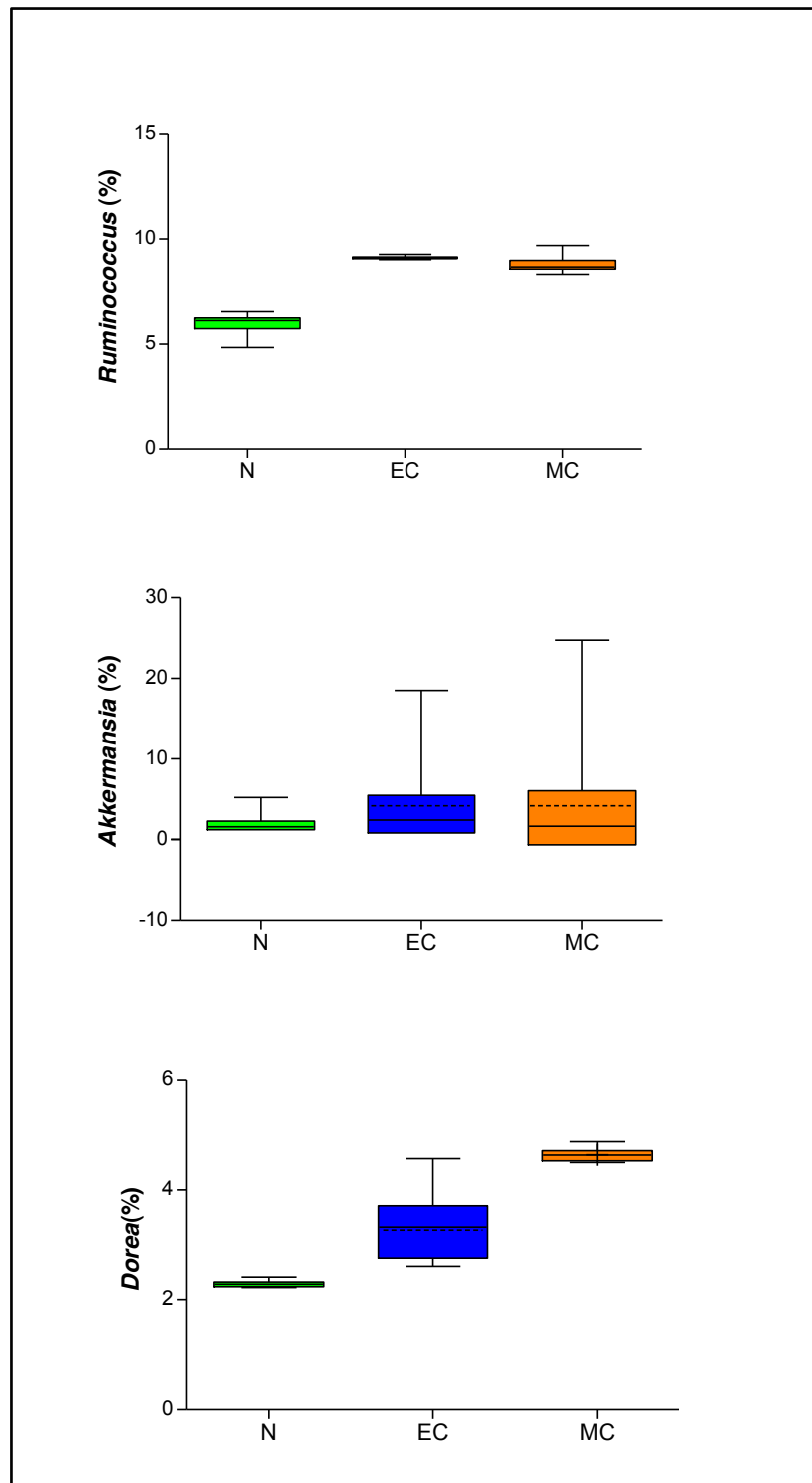


**Figura 13E:** Cambios en la abundancia relativa (%) de *Methanobrevibacter* entre las tres condiciones del estudio (N, EC, MC) ( $P > 0,05$ ).

Además, observamos que la ingesta de chocolate con leche aumentó la abundancia de los géneros *Ruminococcus* ( $P = 0,021$ ) y *Dorea* ( $P = 0,007$ ), entre otros (**Figura 13E**). Mientras que la significación se perdió cuando se ajustó por el valor inicial de cada condición (Figura 13F). No obtuvimos diferencias significativas en el caso de *Akkermansia*.



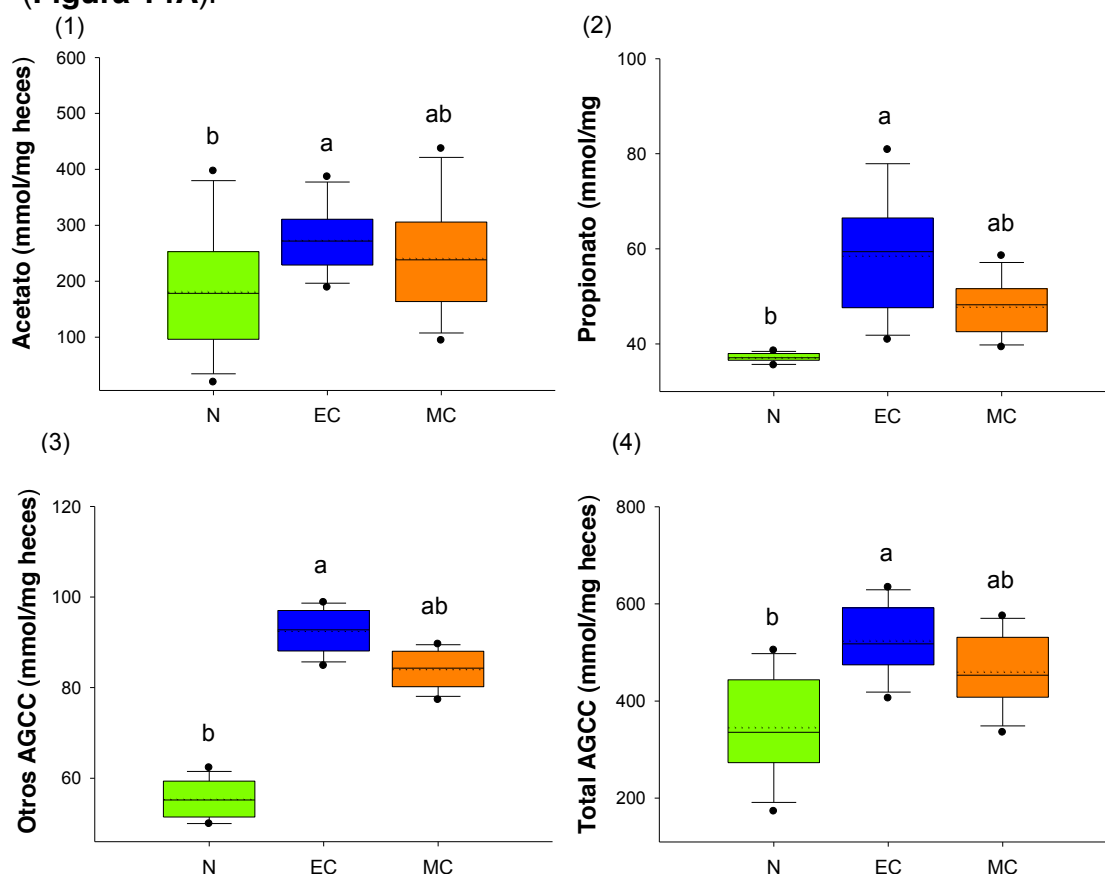
**Figura 13E:** Cambios en la abundancia relativa (%) de *Ruminococcus*, *Akkermansia* y *Dorea* entre las tres condiciones del estudio (N, EC, MC). Las diferencias entre condiciones se analizaron por comparación por pares (diferentes letras representan diferencias significativas ( $P < 0,05$ )).



**Figura 13F:** Cambios en la abundancia relativa (%) *Ruminococcus*, *Akkermansia* y *Dorea* entre las tres condiciones del estudio (N, EC, MC) tras ajustar por el valor inicial de cada condición.

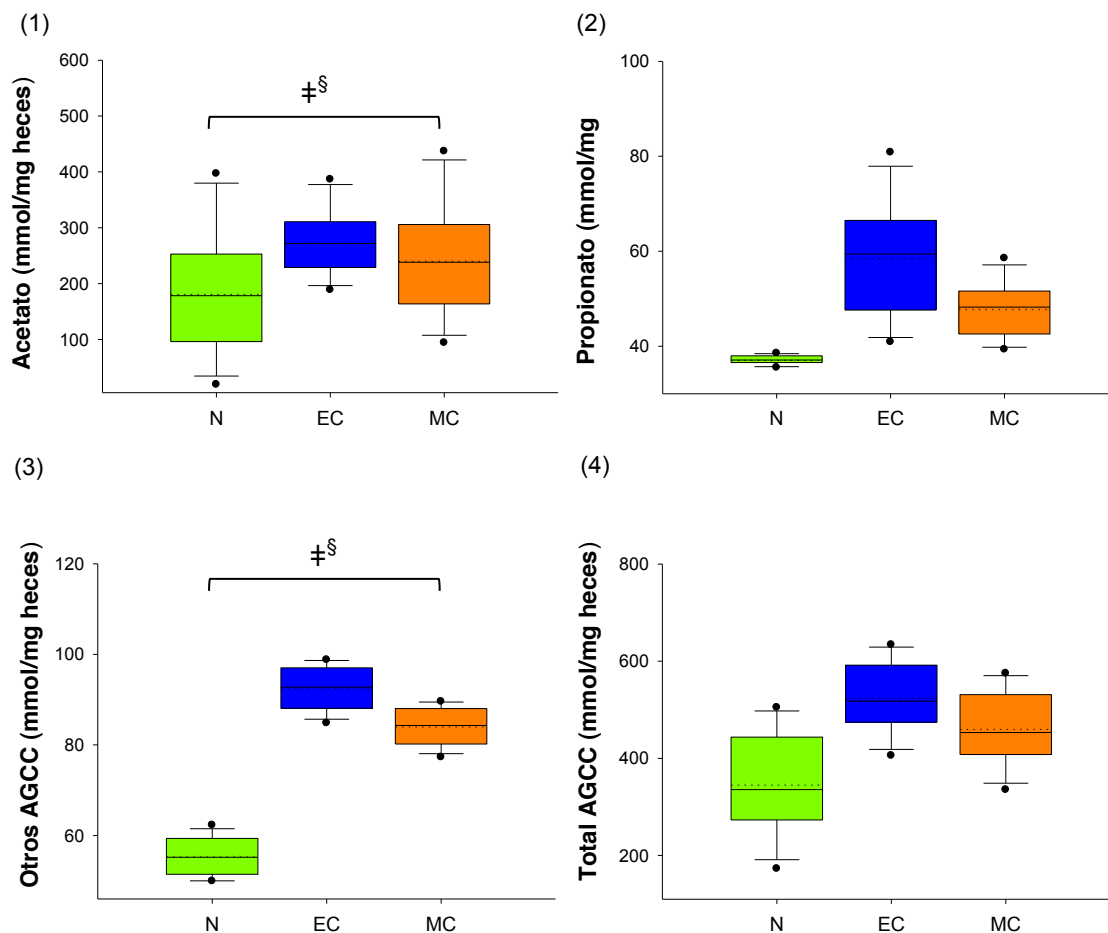
## 2. En cuanto a la función de la microbiota

En el presente trabajo se observa cómo el consumo de chocolate aumentó significativamente la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como son: acetato, propionato (una tendencia  $P= 0,060$ ) y otros ácidos grasos menores (isobutirato, isovaleronato y valeronato), en comparación con no tomar chocolate (Control). Concretamente este aumento fue mayor en la condición de noche comparada con control. Mientras que los valores de AGCC después de tomar el chocolate en la mañana aunque aumentaron con respecto al control no llegaron a ser tan elevados como en la condición de noche (Figura 14A).



**Figura 14A:** Concentración de AGCC en muestras de heces simples para las tres condiciones (Noche (EC), Mañana (MC) y Control (N)). (1) Acetato, (2) propionato, (3) otros AGCC minoritarios y (4) AGCC totales. Las diferencias significativas entre condiciones ( $P < 0,05$ ), calculadas mediante el test de comparación por pares se indican con diferentes letras. El cuadro indica los cuartiles superior e inferior, la línea punteada dentro del cuadro indica la media y la línea delgada indica la mediana; las líneas verticales indican los percentiles 90-10 y los puntos son valores atípicos ( $n = 12$ ).

Sin embargo, al ajustar por el valor inicial de la primera condición se perdió la significación para el propionato y los AGCC totales (**Figura 14B**).



**Figura 14B:** Concentración de AGCC en muestras de heces simples para las tres condiciones (Noche (EC), Mañana (MC) y Control (N)) tras ajustar. (1) Acetato, (2) propionato, (3) otros AGCC minoritarios y (4) AGCC totales. #§ Representa una tendencia ( $P < 0,09$ ). El cuadro indica los cuartiles superior e inferior, la línea punteada dentro del cuadro indica la media y la línea delgada indica la mediana; las líneas verticales indican los percentiles 90-10 y los puntos son valores atípicos ( $n = 12$ ).

Según nuestros resultados, el efecto beneficioso de la ingesta de chocolate es apoyado por el aumento de los valores de *Ruminococcus* (**Figura 13E**), que se asocia con valores elevados de acetato ( $P = 0,039$ ) (**Figura 17**, en el apartado de Discusión), y el descenso de los valores del género *Lachnospiraceae* (**Figura 13C**), lo cual se asoció con una reducción de acetato ( $P = 0,026$ ).

### 3. Asociación entre composición y función de la microbiota

Con el fin de comprender las asociaciones complejas existentes entre la composición y la actividad microbiana, se utilizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para visualizar las relaciones entre los grupos bacterianos y los diferentes AGCC entre las tres condiciones (**Figura 18** en el apartado de Discusión), **Tabla 11**.

En particular, la información proporcionada permitió la separación gráfica de las diferentes condiciones (N, EC y MC), lo cual demuestra que la ingesta de chocolate y lo que es más importante el horario de la ingesta de chocolate, da como resultado perfiles y funciones de microbiota diferenciados (Figura 18, panel 1, en el apartado de Discusión).

**Tabla 11: Matriz de factor rotado para datos de población de bacterias y ácidos grasos de cadena corta (AGCC)\*. (\*Se han eliminado cargas de factor menores a 0,5).**

	Componentes					
	1	2	3	4	5	6
Valeronato	0,907					
Isovaleronato	0,895					
Otros AGCC minoritarios	0,892					
<i>Methanobacteriaceae</i>	0,885					
AGCC totales	0,824					
Isobutirato	0,791					
Propionato	0,774					
Butirato	0,767					
<i>Akkermansia</i>	-0,559				0,53	
<i>Firmicutes</i>		-0,903				
<i>Adlercreutzia</i>		0,899				
<i>Methanobrevibacter</i>		0,892				
<i>Peptostreptococcaceae</i>		0,884				
Índice Simpson inverso		-0,63			-0,539	
Ratio Acetato:Propionato			0,792			
Acetato			0,697			
<i>Streptococcaceae</i>			0,646	0,639		
<i>Ruminococcus</i>			0,642	0,639		
<i>Faecalibacterium</i>			-0,582		-0,518	
<i>Dorea</i>			-0,567			
<i>Clostridiaceae</i>				0,882		
<i>Streptococcus</i>				0,876		
<i>Verrucomicrobiaceae</i>					-0,75	
<i>UnLachnospiraceae</i>					0,634	
<i>UnClostridiaceae</i>					0,595	
<i>Eubacterium</i>						0,888
% varianza	32,96	18,07	11,7	8,87	5,76	4,93
% varianza acumulada	32,96	51,03	62,73	71,61	77,37	82,3

Estas diferencias fueron marcadas principalmente por metabolitos bacterianos (AGCC) producidos por la microbiota, lo que indica que los AGCC podrían ser un buen biomarcador para explicar, al menos en parte, las diferencias encontradas entre las diferentes condiciones.

En el análisis de componentes principales (Figura 18, panel 2, en el apartado de Discusión) *Ruminococcus* aparece en el tercer factor, junto con Acetato y con el ratio de Acetato:Propionato, lo cual tiene sentido considerando la correlación positiva y significativa encontrada entre la abundancia de *Ruminococcus* y los niveles de acetato (Figura 18).

**Resultados en relación al objetivo 5:** sobre los cambios producidos por la ingesta de chocolate en la composición y función de la microbiota intestinal nuestros resultados muestran, una disminución en la abundancia de *Firmicutes*, de *Lachnospiraceae* y de la diversidad microbiana cuando tomaban chocolate. La ingesta de chocolate aumento la abundancia de *Ruminococcus* y *Dorea*.

En cuanto a la producción de AGCC la ingesta de chocolate aumentó la producción de acetato, propionato y otros ácidos grasos menores (isobutirato, isovaleronato y valeronato) en comparación con no tomar chocolate.

El análisis de componentes principales (PCA) muestra que la ingesta de chocolate y lo que es más importante el horario de la ingesta de chocolate, da como resultado perfiles y funciones de microbiota claramente diferenciados.



# DISCUSIÓN

---



## 1. Sobre el efecto de la ingesta de chocolate en el peso corporal y en la circunferencia de cintura

En el presente trabajo se muestra que las voluntarias que han participado en este ensayo no sufrieron un aumento de peso significativo tras el consumo de chocolate. Estos resultados resultan sorprendentes ya que el chocolate es un alimento de alta densidad calórica (542 kcal/100 g) y las voluntarias del estudio ingirieron una cantidad elevada del mismo (100 g/día). Además, el consumo de chocolate se realizó durante un periodo relativamente largo, que comprendió catorce días en la condición de mañana y catorce días en la condición de noche.

Según la teoría de Wishnofsky (102), también llamada “regla de las 3.500 kcal”, con la que se estima el aumento de peso corporal según la ingesta calórica, un exceso de 3.500 kcal semanales debería dar lugar a un aumento de 0,5 kg de peso. En el presente estudio en el que las voluntarias ingirieron 100 g de chocolate al día, el incremento diario de energía fue de 542 kcal, o lo que es lo mismo 3.794 kcal por semana, lo que supondría un aumento de peso corporal de más de 0,5 kg por semana.

Según esta norma, y teniendo en cuenta que cada intervención con chocolate tuvo una duración de 14 días, estas mujeres postmenopáusicas deberían haber ganado más de 1 kg de peso durante cada intervención con chocolate (2 semanas\*7días\*542 kcal= 7.588 kcal). Esto sucedería, siempre y cuando no hubiera cambios en la ingesta de otros alimentos (las voluntarias podían comer *ad libitum*) o se produjera un aumento del gasto energético (102).

Si recordamos lo ya mencionado en la introducción de este trabajo, la obesidad es, en la actualidad, un importante problema de salud pública, y se asocia con una mayor incidencia de enfermedades tales como osteoartritis, diabetes tipo 2, y ciertos tipos de cáncer (191-194) entre otras enfermedades metabólicas. Lo cual conlleva además un alto coste económico y social (195). Por otra parte, el chocolate es un alimento muy consumido en todo el mundo, que destaca por su elevado contenido en grasa, en azúcar y en definitiva por su gran aporte calórico.

Por todo ello, los resultados obtenidos en el presente trabajo tienen gran interés para la sociedad actual, en especial en una población de riesgo de obesidad como son las mujeres postmenopáusicas.

**Desde hace años, existe cierta discusión en cuanto a los efectos del chocolate sobre el peso corporal.** Múltiples estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de chocolate se asocia con una disminución del Índice de Masa Corporal (IMC), del peso corporal y de la circunferencia de cintura.

Se podría pensar que estos resultados, inicialmente sorprendentes, podrían estar influenciados por cambios en la actividad física, la ingesta energética y la composición dietética. Sin embargo, en estos estudios se ajustó por estos factores, lo que sugiere que la pérdida de peso se debía a un efecto directo del chocolate, es decir a que el chocolate adelgaza (196, 197). Sin embargo, los resultados anteriores, que coinciden con algunos de los nuestros, no se replican en todos los estudios. Así, el estudio realizado por Greeberg *et al.* (65) en 2013, muestra que la ingesta de chocolate a largo plazo se asocia con un aumento significativo de peso corporal, lo que en principio resulta más predecible.

Ensayos clínicos aleatorios realizados con anterioridad (2007, 2010 y 2011) también han mostrado resultados contradictorios. Es el caso del estudio realizado por Piehoswki *et al.* (198) en sujetos con sobrepeso que se sometían a una restricción calórica, y en el que se evaluaron los efectos de una merienda con chocolate negro y de otra sin chocolate, los resultados mostraron que se producía una disminución en el peso corporal y en el porcentaje de grasa corporal en todos aquellos individuos que realizaban una merienda de forma habitual, independientemente de que tomaran o no chocolate. De igual manera Golomb *et al.* (196) observaron un menor peso corporal en los consumidores habituales de chocolate. Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo por Conversely Desch *et al.* (199), mostraron un ligero aumento de peso corporal después de tres meses de consumo de 25 gramos de chocolate negro al día. Mientras que, en otro ensayo aleatorio controlado desarrollado por Taubert *et*

*al.* (200), no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal después de la ingesta diaria de 6,3 g de chocolate negro durante 18 semanas.

En el año 2018, Kord-Varkaneh H *et al.* (69), en un intento de resolver estas contradicciones sobre el efecto de la ingesta del chocolate en el peso corporal y con el fin de llegar a resultados concluyentes, realizaron una revisión sistemática exhaustiva. En ella se incluyó un meta-análisis de todos los ensayos clínicos disponibles hasta ese momento, sobre el efecto de la ingesta de cacao o derivados (chocolate) en el peso corporal, la circunferencia de cintura y el IMC en adultos. Los autores analizaron 35 artículos en total, publicados entre los años 2003 y 2017.

Como resultado principal de esta revisión, los autores concluyeron que la ingesta de chocolate comparada con el grupo control (no tomaban chocolate), no afectaba al peso corporal, al IMC, ni a la circunferencia de cintura. Estos resultados coinciden con los nuestros a pesar de las diferencias en población, sexo y edad, y en el tipo de chocolate consumido, ya que en la revisión de estudios de Kord-Varkaneh H *et al.* (69), se trataba de chocolate negro.

Todos los estudios incluidos en el meta-análisis de Kord-Varkaneh H *et al.* (69) cumplían los siguientes requisitos: 1) se realizaron en individuos adultos (>18 años), hombres y mujeres; 2) presentaban un grupo de intervención con chocolate y un grupo control; 3) el número de participantes en cada estudio estaba comprendido entre 20 y 90 individuos, alcanzándose un total de n=1.775 sujetos en el meta-análisis; 4) al igual que en nuestro trabajo, se estudiaron el peso, IMC y circunferencia de cintura, como principales variables, tanto al inicio (baseline) como al final del experimento; 5) en todos los estudios considerados se utilizó chocolate negro o cacao en polvo, lo que difiere de nuestro estudio que se ha hecho por primera vez con chocolate con leche y en mujeres postmenopáusicas.

La duración de la intervención es un aspecto relevante a considerar en la interpretación de los resultados. En el caso de nuestro experimento, la duración del consumo de chocolate fue de cuatro semanas (28 días), incluyendo la condición de chocolate por la mañana y por la noche.

Aunque no se trata de una duración larga, debido al elevado aporte calórico del chocolate (542 kcal/día), esperábamos poder detectar un efecto sobre el peso corporal siempre y cuando no se compensara con una disminución de la ingesta calórica ad libitum y/o con un mayor gasto energético durante el experimento.

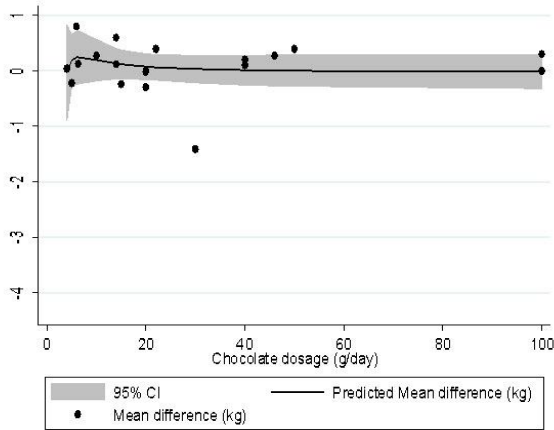
Además, estudios previos realizados con chocolate (sin incluir el momento de la ingesta del mismo) han mostrado duraciones similares. Es el caso del meta-análisis de Kord-Varkaneh H *et al.* (69), en el que de los 30 estudios seleccionados, la mayoría tuvo una duración similar o inferior a la nuestra (n=18); 11 estudios tuvieron duraciones más largas (de 6 a 8 semanas), mientras que solo 1 estudio tuvo una duración de 24 semanas.

La conclusión general de esta revisión fue que el chocolate no tuvo un efecto significativo sobre el peso corporal, de hecho en ensayos cuya duración era de 4 a 8 semanas, el peso corporal y el IMC no mostraban cambios significativos (201, 202) con suplementos  $\geq 30$  g de chocolate por día. Es el caso de un estudio que realizaron Ried Karin *et al.* (201) en 2009, en el que tras 8 semanas con una ingesta de 50 g/día de chocolate, no se observaron diferencias significativas en el peso, ni en el IMC. Sin embargo, y en contra de lo esperado, cuando la duración del consumo era menor (ensayos de  $\leq 4$  semanas de duración), la ingesta de suplementos de chocolate producía un aumento significativo del IMC (70, 71). Por el contrario, en duraciones más largas (ensayos de  $>8$  semanas de duración), el peso corporal se reducía (72, 73).

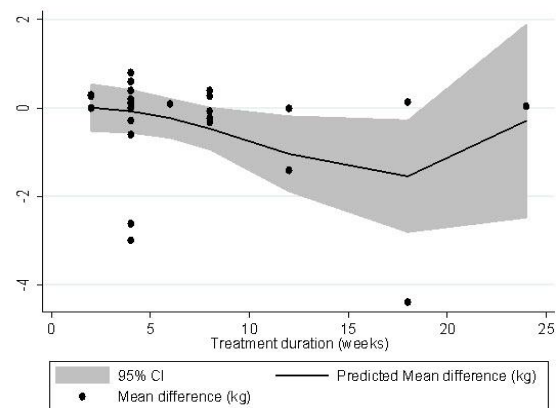
De hecho, Kord-Varkaneh *et al.* concluyeron que la duración de la intervención no fue crítica para los efectos del chocolate sobre el peso corporal, mientras que, los efectos positivos en la circunferencia de cintura, si los hubo, fueron más evidentes con duraciones más largas (73, 200, 203, 204). (Véase **Figura 15**).

**Peso**

Dosis chocolate:  $P= 0,423$

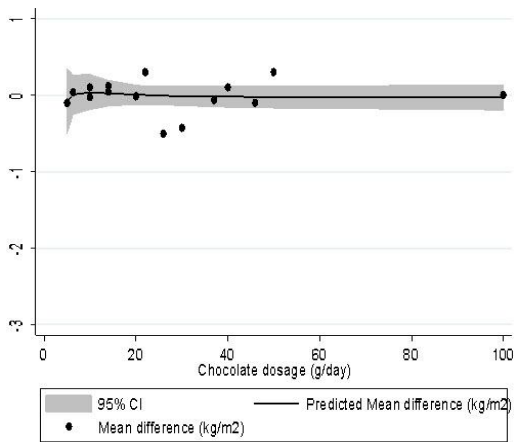


Duración:  $P= 0,072$

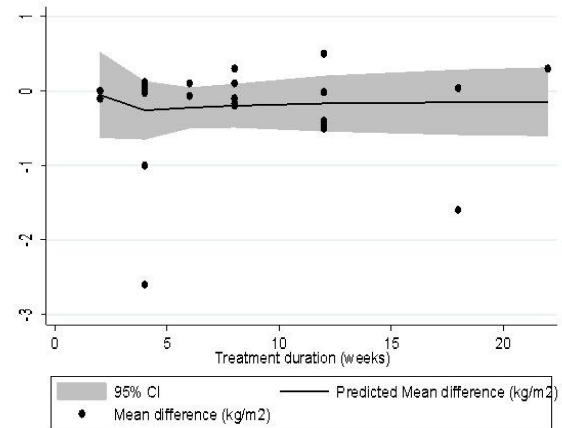


**IMC**

Dosis chocolate:  $P= 0,584$

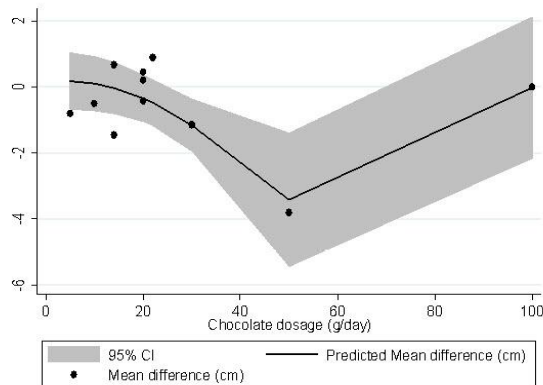


Duración:  $P= 0,636$

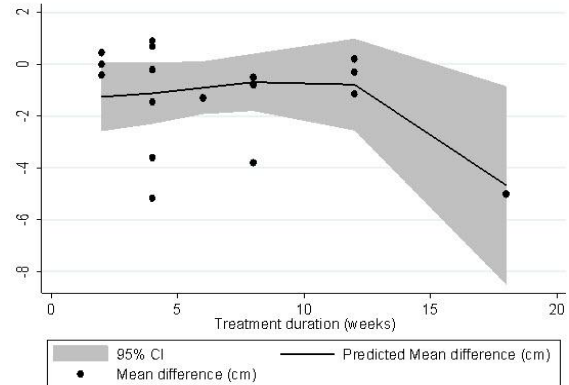


**Circunferencia cintura**

Dosis chocolate:  $P= 0,008$



Duración:  $P= 0,214$



**Figura 15:** Impacto de la dosis de chocolate y la duración de la intervención en el peso corporal, el IMC y la circunferencia de cintura de una revisión sistemática anterior (69).

En nuestro estudio con una ingesta de chocolate de 4 semanas de duración, no se produjo un aumento significativo del peso corporal. Aun así, a la hora de establecer recomendaciones, debemos tener en cuenta que aunque otros trabajos muestran que para perder peso se requiere una mayor duración del consumo de chocolate (69, 73), la recomendación de una ingesta de 100 g/día de chocolate con leche durante un período de tiempo más largo debería considerarse con precaución. Harían falta más estudios en los que se analice el consumo de chocolate a horas diferentes del día y con duraciones más largas de intervención para poder llegar a conclusiones definitivas.

La cantidad de chocolate consumido es otro factor relevante a considerar en estos estudios. En nuestro trabajo las voluntarias consumieron 100 g de chocolate al día durante las cuatro semanas que duraron las intervenciones con chocolate, mientras que en todos los estudios revisados por Kord-Varkaneh H *et al.* (69), la cantidad de chocolate consumido varió entre 6,3 y 100 g día.

#### La importancia de los polifenoles

Es sorprendente que las voluntarias que han participado en esta tesis doctoral no hayan engordado, y tratando de buscar una respuesta a nuestros resultados, hemos comprobado que otros autores han encontrado la explicación en la presencia y concentración de varios compuestos fenólicos en el chocolate (36).

Un meta-análisis reciente llevado a cabo por González Sarria *et al.* (67) en el año 2017, sugirió que el consumo de compuestos ricos en **flavanoles** podría reducir el IMC y la circunferencia de cintura. El cacao contiene una cantidad elevada de **epicatequinas, catequinas y procianidinas**, lo que podría explicar los resultados obtenidos (37, 68). Aunque no se conocen los mecanismos exactos, se han sugerido las siguientes vías de acción de los flavanoles sobre factores implicados en el peso corporal y enfermedades asociadas:

- Mejora de la sensibilidad a la insulina y de la pérdida de peso (205-207).



- Disminución de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos, colesterol y lipogénesis (208, 209).
- Incremento de la termogénesis y el gasto energético (205, 210).
- Efecto inhibitorio del cacao sobre la lipasa y la amilasa pancreática (211).
- Disminución del apetito a través de diferentes hormonas, como aumento de GLP-1 y disminución de la concentración de ghrelina (176, 212).

Ali F *et al.* (213) en el año 2016, llevaron a cabo un estudio con el fin de investigar la actividad farmacológica de los **polifenoles** del cacao sobre los marcadores de obesidad visceral. Los resultados de este estudio explicaron en parte los mecanismos implicados en los efectos favorables de estos polifenoles sobre los marcadores de obesidad. Entre ellos, los polifenoles a) inhibían la lipogénesis; b) disminuían la expresión de enzimas lipogénicas (acetil-coenzima A carboxilasa, ácido graso sintasa, malonil CoA:ACP aciltransferasa, estearoil-coenzima A desaturasa); y c) promovían la expresión de los genes relacionados con la oxidación de la grasa como es la vía de la AMPK (Proteín Kinasa Activada por AMP) (213).

#### La importancia de las metilxantinas

En la misma línea, otro estudio desarrollado por Yamashita *et al.* (214) en el año 2018, reveló que la **metilxantina**, alcaloide presente en el extracto de cacao en forma de teobromina, disminuye la acumulación de grasa en el adipocito mediante el incremento de la expresión de la enzima lipolítica (AMPK).

Teniendo en cuenta que tanto los polifenoles como las metilxantinas, cafeína, teobromina y teofilina, son abundantes en otros alimentos y bebidas de frecuente consumo, y puesto que las voluntarias continuaron con su dieta habitual *ad libitum*, en este trabajo hemos analizado el contenido en estos compuestos en la dieta.

Nuestros resultados muestran que los hábitos dietéticos durante las diferentes condiciones fueron similares. De hecho, el tipo y la cantidad de alimentos ricos en polifenoles y el contenido total de polifenoles de la dieta no difirieron significativamente entre las condiciones cuando no se consideró la ingesta de chocolate.

Además, la epicatequina y la catequina (que son los principales polifenoles del chocolate) no difirieron entre las condiciones objeto de estudio. Por lo tanto, podemos concluir que tales efectos se debieron solo al chocolate consumido por las voluntarias y no a otros alimentos/bebidas también ricos en polifenoles. En lo que se refiere a la cafeína, el contenido de la misma fue significativamente diferente entre las condiciones estudiadas, siendo significativamente mayor en la condición de mañana que en la de noche (véase Tabla 10).

Esta disminución del peso corporal podría atribuirse a que poder tomar un capricho dulce reduce los antojos y mejora la satisfacción de una dieta (198). Así pues, se ha sugerido que la **restricción de un alimento deseado**, como puede ser el chocolate, podría no ser adecuada para controlar el peso (215). De hecho, se ha demostrado en dietas bajas en calorías, una pérdida de peso similar cuando el chocolate diario está incluido o cuando está prohibido (198). En este sentido, podemos afirmar que la prohibición de ciertos alimentos considerados caprichos, como es el caso del chocolate, puede conducir a un mayor abandono en programas de control de peso y a un menor éxito en los resultados conseguidos en los mismos (198).

Los resultados contradictorios encontrados con anterioridad sobre la conveniencia de recomendar chocolate por sus efectos sobre el peso corporal, el IMC, o la adhesión a una dieta de adelgazamiento, así como la escasez de ensayos realizados con chocolate con leche y con una duración de la intervención relativamente corta, ponen de manifiesto la necesidad del trabajo llevado a cabo en esta tesis doctoral.

**En resumen sobre el objetivo 1:** podemos concluir tras los resultados obtenidos que la ingesta de 100 g de chocolate con leche durante las cuatro semanas de intervención (14 días por la mañana, y 14 días por la noche) no afecta significativamente al peso, al IMC, ni al porcentaje de grasa corporal. Ahora bien, la recomendación de esta cantidad de chocolate con leche a largo plazo debe hacerse con precaución debido a la gran carga calórica de este alimento siendo recomendable la realización de estudios posteriores.

## **2. Sobre el posible papel de la ingesta y el gasto energético en la ausencia de aumento de peso tras la ingesta de chocolate**

Uno de los propósitos de esta tesis doctoral ha sido averiguar los posibles mecanismos que ayudan a explicar la ausencia de aumento de peso tras la ingesta de chocolate con leche, alimento de gran densidad calórica.

El balance de energía en el individuo se explica mediante una ecuación con dos brazos, la ingesta y el gasto energético. Nos adentramos en cada una de las partes de esta ecuación para tratar de dar respuesta al porqué de la ausencia de aumento de peso.

### **2.1 En relación a la ingesta energética**

De acuerdo con estudios previos (216), nuestros resultados muestran que el chocolate redujo el hambre, el apetito y el deseo de dulces, lo cual coincide y puede estar relacionado con la reducción observada en la ingesta de energía *ad libitum* de las voluntarias. Esto sucedió a pesar de que las voluntarias consumieron chocolate con leche, que ha demostrado tener menos efecto en la disminución del apetito que el chocolate negro (217).

Los resultados respecto al hambre, el apetito y el deseo de dulces, se obtuvieron del test de escala visual que realizaron las participantes durante los tres últimos días de cada condición. Se apreció una disminución significativa en estas tres sensaciones especialmente cuando tomaban el chocolate en la condición de noche.

En los últimos años, se han realizado diversos estudios que analizan el efecto del chocolate puro sobre el apetito, frente al chocolate con leche. Es el caso de un estudio llevado a cabo por Sørensen y Astrup (218) en el año 2011, en el que demostraron en un grupo de jóvenes sanos, que el consumo de 100 g de chocolate negro (con un 70% de cacao) promovió la saciedad, redujo el hambre y la ingesta de energía *ad libitum* en la siguiente comida, en comparación con una cantidad equivalente de chocolate con leche (con un 30% de cacao).

En 2014, otro grupo de investigación liderado por Akyol *et al.* (219), demostró que la sustitución del chocolate con leche por chocolate puro, en una receta tradicional turca, reducía de forma significativa el consumo de energía *ad libitum* en el almuerzo.

Más recientemente, en el año 2017, se realizó un experimento en mujeres postmenopáusicas con el fin de comparar los efectos de la ingesta de chocolate puro, chocolate con leche y chocolate blanco sobre la ingesta posterior (217). Los resultados mostraron que, para las mujeres que consumían chocolate, el chocolate de elección debería ser el puro por su efecto beneficioso al moderar la ingesta total de energía de la dieta (217).

Tal y como se ha indicado en el apartado de resultados, en nuestro experimento las voluntarias redujeron espontáneamente su consumo de energía *ad libitum* en un 16% al tomar chocolate con leche por la mañana y ( $P=0,01$ ). Como era de esperar, hemos observado que aquellas mujeres que ganaron menos peso tomando el chocolate en la condición de noche fueron las que compensaban mejor la ingesta calórica.

**Componentes específicos** del chocolate podrían ser responsables de este efecto compensatorio. Se ha demostrado en un estudio que comparó varias mezclas de cacao, que éstas solo se asocian con una disminución significativa en la ingesta de alimentos cuando se complementan con epicatequina, un flavonoide antioxidante presente en el chocolate, mientras que no sucede lo mismo con una mezcla de cacao sin epicatequina (220). Nuestras voluntarias presentaron un aumento en el consumo de polifenoles totales de 854,34 mg por día (principalmente epicatequina y catequina) debido al chocolate con leche ingerido (100 g), mientras que no se encontraron diferencias significativas en el contenido de polifenoles de otros alimentos consumidos. Además, la adherencia a la Dieta Mediterránea, caracterizada por alto contenido en polifenoles, fue similar entre las condiciones objeto de estudio (véase Tabla 10). De estos resultados se deduce, que el aumento de polifenoles debido al chocolate, podría estar influyendo en la reducción de ingesta energética cuando se consumió chocolate.

Pensamos que la **composición de macronutrientes del chocolate con leche** también puede ser responsable de esta compensación calórica (ver Figura 9A). De hecho, al tomar chocolate en la condición de mañana, las voluntarias disminuyeron su consumo de energía *ad libitum* al reducir la grasa (-17 a 7 g/d) y los carbohidratos (-27 a 17 g/d) comparado con la condición de control ( $P<0,05$ ), y no hubo diferencias significativas en cuanto a las proteínas ( $P>0,05$ ). Estos resultados coinciden con la ingesta adicional de macronutrientes que supone el consumo de chocolate con leche, el cual es rico en grasas (31 g) y carbohidratos (58 g), y bajo en proteínas (6 g) (**Tabla 12**). Las participantes compensaron el 53% de los carbohidratos aportados por el chocolate y, en menor medida, en un 45%, la grasa aportada por el chocolate ( $P<0,05$ ).

**Tabla 12: Composición nutricional del chocolate con leche extrafino Nestle<sup>®</sup>, utilizado en el presente estudio.**

Información nutricional	100g	% IR
Calorías	542 Kcal	5%
Valor energético	2.264 kJ	
Grasas totales	31,1 g	8%
Ácidos grasos saturados	17,9 g	16%
Hidratos de carbono	58,4 g	4%
Azúcares	57,5 g	11%
Fibra alimentaria	1,8 g	
Proteínas	6,3 g	2%
Sal	0,16 g	1%
Vitaminas y Minerales		
	100g	
	167 mg	
Calcio	21% VRN	
(% IR: Ingesta de Referencia de un adulto medio (8.400 kJ/2.000 kcal); VRN: Valores de Referencia de Nutrientes). Una tira de 17,8 g equivale a 5 onzas de chocolate. <a href="https://es.openfoodfacts.org/producto/7613035268388/chocolate-con-leche-nestle">https://es.openfoodfacts.org/producto/7613035268388/chocolate-con-leche-nestle</a> .		

**La percepción de hambre y de apetito por dulce** son variables difíciles de cuantificar ya que se trata de sensaciones subjetivas. En el diseño de este trabajo se escogió un cuestionario llamado VAS (Visual Analogic Scale o también conocido como test de escala visual analógica), por ser el que mejor nos permite medir los cambios en ambas sensaciones tras la ingesta de chocolate en diferentes momentos del día. Como hemos explicado en el apartado de material y métodos, las voluntarias realizaron este cuestionario en diversos momentos del día durante los tres últimos días de cada condición.

Este cuestionario utiliza una escala de respuestas psicométricas. Se trata de un instrumento de medición que intenta cuantificar una característica, actitud o sensación que aunque es continua puede presentar variaciones y que no se mide fácilmente de forma directa (221). Al responder sobre el hambre o el apetito por dulce, las encuestadas marcaron una posición a lo largo de una línea continua entre dos puntos finales, cuantificando así sus sensaciones para un momento determinado de día.

La disminución del hambre y del apetito por dulce que han experimentado las participantes, ha podido contribuir a la reducción voluntaria de la ingesta energética total que se ha producido cuando tomaban chocolate.

Nuestros resultados muestran además, que los valores diarios de **cortisol** fueron significativamente más bajos al tomar chocolate en la condición de mañana que en la de noche. En el año 2000 se publicó un estudio realizado por Epel *et al.* (222) en el que se planteaba como hipótesis que los elevados valores de cortisol que se generan en respuesta al estrés, pueden llevar a comer después de una situación de este tipo. Para probarlo, estos investigadores expusieron a 59 mujeres premenopáusicas sanas a una sesión de estrés y a otra de control en diferentes días. Las mujeres que tuvieron valores más altos de cortisol comieron más el día del estrés. Mientras que valores más bajos de cortisol se relacionaron con un apetito más bajo asociado al estrés, lo que pensamos puede ayudar a explicar en parte la mejor compensación calórica que se ha observado en nuestras voluntarias cuando han tomado chocolate en la condición de mañana (222).

**Factores psicológicos**, tales como una menor percepción de restricción al no existir prohibición sobre la ingesta de ningún alimento y al consumir un alimento considerado por muchas personas como un capricho, así como la reducción del apetito relacionado con el estrés (cortisol), pueden estar influyendo en la reducción de la ingesta de energía, independientemente del estado de energía del individuo o de la palatabilidad de los alimentos consumidos (198, 223, 224).

La disminución del deseo de dulces puede también estar relacionada con la **reducción de los antojos** y con la adhesión y satisfacción del seguimiento de una dieta, lo cual se asocia al sentimiento de placer y celebración relacionado con la ingesta de chocolate (225). Varios estudios previos (225, 226) mostraron que aquellos individuos que asociaban la ingesta de pastel de chocolate con sentimiento de culpa, tenían menor control sobre el comportamiento alimentario y mayor tendencia a conductas alimentarias poco saludables, en comparación a las personas que asociaban pastel de chocolate a celebración. En la misma dirección, otra investigación llevada a cabo por Piehowsky *et al.* (198) en el año 2011, en mujeres con sobrepeso u obesidad, mostró mejoras en las medidas antropométricas y de composición corporal, tras una dieta baja en calorías que incluía una merienda diaria con chocolate.

Sin embargo, a pesar de todos estos factores en el presente estudio, **la disminución en la ingesta de energía que se produjo no fue suficiente para compensar** completamente la energía extra derivada de la ingesta de chocolate por parte de las participantes en el estudio, por lo que otros factores además de este, deben estar influyendo en que las participantes no engorden con el chocolate.

## 2.2 En relación al gasto de energía

El otro brazo de la ecuación para el balance de energía, además de la ingesta, es el gasto de energía (69, 176). De hecho, el sobrepeso y la obesidad son considerados como el resultado de un balance calórico positivo, es decir, un



desequilibrio entre la ingesta y el gasto energético, siendo la ingesta mayor que el gasto (47).

Nuestros resultados mostraron **un aumento del 6,9% en la actividad física** de las voluntarias al consumir chocolate en la condición de noche en comparación con la de control. Las diferencias en el promedio de la actividad física fueron significativas durante la noche y el día (véase Figuras 10A, 10B y 10C del apartado de resultados).

Respaldado por muchos estudios científicos y por la experiencia común, actualmente la obesidad se atribuye a un exceso de consumo de calorías en relación al trabajo realizado (53). Esto se expresa popularmente como “**calorías que entran y calorías que salen**”. Crear un déficit en este equilibrio conduce a una pérdida de peso independiente de si se produce por una menor ingesta calórica o por un aumento en el gasto de energía (53). Las calorías que “salen” o dicho de otro modo que se gastan o consumen corresponden a: 1. El requerimiento de energía en reposo o metabolismo basal; 2. Actividad física: que puede considerarse la suma de la actividad basal de la vida diaria y la actividad deliberada o también conocida como ejercicio específico; 3. En menor medida, a la termogénesis producida por los alimentos.

Por tanto, un mecanismo para aumentar el gasto de energía podría ser el **aumento espontáneo de la actividad física** después de una ingesta calórica elevada.

En el presente estudio la actividad física se determinó mediante el uso de un actímetro, herramienta que nos ha permitido analizar la actividad de las voluntarias de forma objetiva. Nuestros resultados muestran un aumento de la actividad física, en especial cuando el chocolate se consumió por la noche. Este aumento de actividad se realizó de forma espontánea en las mujeres estudiadas tanto por la noche (después del consumo de chocolate), como por el día.

A este aumento de energía por la actividad física, hay que sumarle que las participantes experimentaron una **disipación de calor** mayor tras ingerir

chocolate en la condición de noche que cuando no comían chocolate (ver Figura 10D). Esta diferencia fue significativa en el promedio de la noche (desde 00:00 a las 05:00 h) (véase Figura 10E en el apartado de resultados), al igual que también lo fueron en períodos específicos durante el día (véase Figura 10F). Concretamente durante la mañana (desde las 10:00. a las 12:00h.), en el período postprandial después del almuerzo (desde las 16:00 a las 19:00h.) y después de cenar (desde las 21:00 a las 22:00 h) lo que nos hace pensar que esta mayor disipación de calor puede estar relacionada con un aumento de la **termogénesis inducida por los alimentos**.

El contenido en **teobromina** presente en el chocolate puede también estar involucrado en estos resultados, al menos en el aumento de la temperatura corporal durante la noche, porque se sabe por investigaciones previas que la teobromina aumenta la producción de calor (227) y que se producen picos de teobromina en plasma alrededor de 2 horas después del consumo de chocolate, mientras que la vida media de este polifenol es de 7 a 8 horas (228, 229).

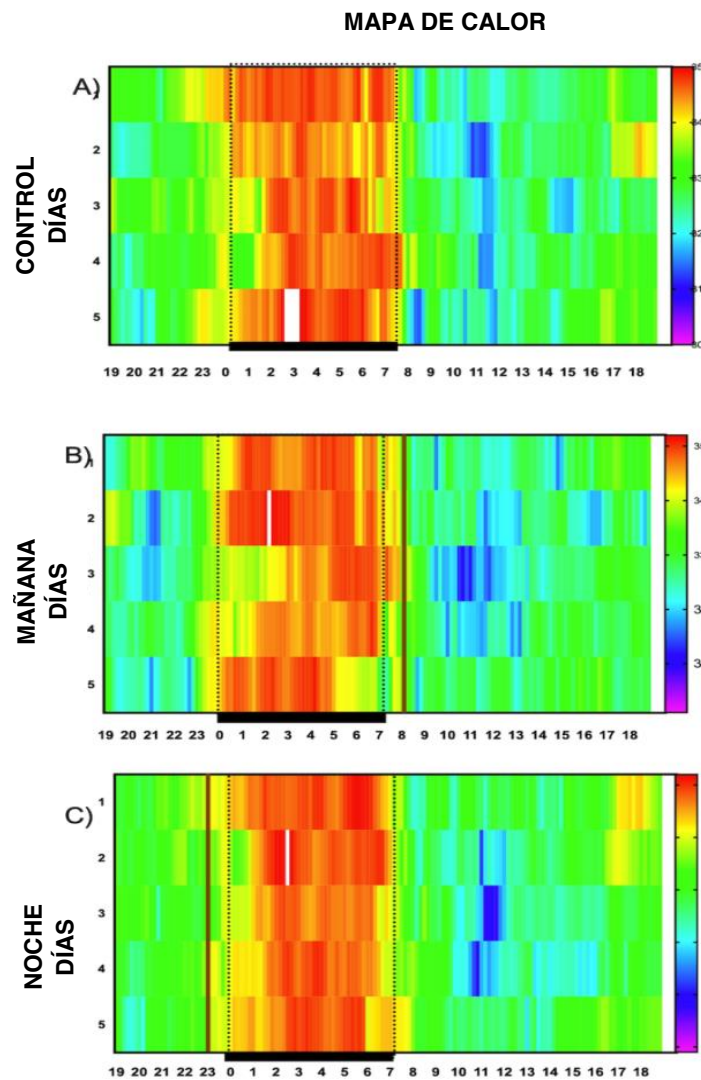
Este aumento observado en la actividad física y en la disipación de calor, podría ser parte del mecanismo por el cual cuando las voluntarias consumieron chocolate en la condición de noche, a pesar de tener un exceso de calorías y una menor compensación calórica, no aumentaron de peso corporal.

### 2.3 Cambios en el sueño y en variables circadianas

Otros de los indicadores estudiados que podrían explicar la ausencia de aumento de peso en las voluntarias de nuestro experimento, son los posibles cambios producidos por la ingesta de chocolate en las características del sueño y en las variables circadianas.

La **Figura 16** representa los llamados mapas de calor, en los cuales se representan los cambios que se produjeron durante las 24h del día en la temperatura periférica de las participantes. La visualización de estos mapas, nos hace pensar que todas las participantes mantuvieron un ritmo diario de temperatura, con valores elevados durante la fase de sueño y valores de

temperatura más bajos durante el día. Este ritmo diario de temperatura se produjo independientemente de si tomaban o no chocolate, o si lo hacían en la condición de mañana o en la de noche.



**Figura 16:** Representa los cambios de temperatura que se producen en las voluntarias durante las 24 horas del día para cada una de las condiciones objeto de estudio. Por la noche, la temperatura varía entre 34 °C y 35 °C, mientras que durante el día oscila entre 31 °C y 34 °C.

No encontramos diferencias significativas según la evaluación objetiva de las voluntarias, en la duración del sueño nocturno entre las distintas condiciones.

Sin embargo, nuestros resultados que se muestran en el mapa de calor, sugieren que la ingesta de chocolate en la condición de noche produjo una mejor sincronización de los episodios de sueño y por tanto una **mayor regularidad del sueño** que en la condición control, tanto dentro de cada mujer como entre ellas. Estos resultados se comprobaron con el registro diario de las mujeres estudiadas.

La regularidad del sueño, entre otras características, es vital para apoyar prácticamente todos los aspectos de la salud humana. En particular, un sueño alterado puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de la enfermedad cardiometabólica (230). De hecho Wittmann *et al.* (231) tras un estudio publicado en 2006, mostraron que cambios frecuentes en los horarios de sueño (la falta de regularidad), concretamente en las horas de inicio y final del sueño, podían contribuir a la desincronización circadiana, ya que el sistema circadiano intrínseco tarda en adaptarse.

En un estudio reciente, desarrollado por Lundsfor *et al.* y publicado en 2020 (232), en el que se evaluó la validez del **índice de regularidad del sueño**, se mostró una mayor irregularidad del sueño con un aumento en obesidad, hipertensión, y con elevados valores de glucemia en ayunas, así como con un aumento del riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular, entre otras alteraciones metabólicas. También se mostraron asociaciones entre la regularidad del sueño y el aumento de variables psiquiátricas como son el estrés percibido y la depresión. Otros estudios han relacionado los patrones de sueño con variaciones en la mortalidad total y en la incidencia de enfermedades cardiovasculares (233, 234).

De forma similar, estudios previos han puesto de manifiesto que alteraciones en los ritmos circadianos del individuo, también pueden predisponer a alteraciones metabólicas, independientemente del efecto de la falta de sueño (235-237).

Se esperaría que el consumo de esta elevada cantidad de chocolate en la condición de noche pudiera causar insomnio debido al elevado contenido de teobromina del chocolate. Sin embargo, no encontramos diferencias

significativas en la fragmentación del sueño y no podemos deducir de nuestros datos que el sueño se haya alterado en las mujeres estudiadas.

Una característica de las poblaciones con baja incidencia de enfermedad coronaria, como es la población mediterránea, en comparación con poblaciones con alta incidencia de esta enfermedad, **es la siesta**.

Fruto del trabajo desarrollado en esta tesis, hemos obtenido una asociación significativa entre tomar chocolate en la condición de mañana y un aumento en la frecuencia de la siesta en comparación con el control ( $4 \pm 0,49$  días de siesta/mes;  $1 \pm 0,21$  días de siesta/mes;  $P= 0,019$ ). Por el contrario, observamos que cuando la ingesta de chocolate se produjo en la condición de noche no se apreció asociación alguna con la frecuencia de dormir la siesta.

En estudios previos se ha descrito que dormir la siesta tiene un impacto metabólico importante (238). Trichopoulos *et al.* (238), en 1987 desarrollaron un estudio para evaluar el efecto a largo plazo de la siesta y de su duración. Los resultados mostraron que una siesta de 30 minutos se relacionaba con una reducción de casi el 30% en la incidencia de enfermedad cardiovascular.

En un estudio posterior, publicado en 2019 y llevado a cabo por Mengxue Chen *et al.* (239), los autores exploraron en una población china la relación entre la duración del sueño nocturno y de la siesta, con la composición corporal. Los resultados mostraron que los sujetos que durmieron siesta tenían una menor prevalencia de sobrepeso (239). Aun así estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo son contradictorios, y sugieren que el efecto de la siesta sobre la salud, depende de la genética. Cuando se estudió la genética de la siesta, y se estimó si la siesta era causa de obesidad, mediante una metodología de Randomización Mendeliana, nuestros resultados mostraron que la siesta podría ser causa de obesidad para la población global (aproximadamente 500.000 sujetos de Inglaterra) (240). Sin embargo, pudimos comprobar la existencia de diferentes subtipos genéticos de siesta y que el efecto de la siesta era beneficioso para unos subtipos, y perjudicial para otros. Hace faltan más estudios al respecto.

En su conjunto, nuestros resultados relativos al efecto del chocolate y la hora de ingesta del mismo, sobre el sueño, tanto sobre la regularidad de sueño nocturno, como sobre la frecuencia de la siesta, podrían explicar en parte las diferencias existentes en el efecto del chocolate sobre el peso corporal y sobre el metabolismo, según se ingiera por la mañana o por la noche.

**En resumen en relación al objetivo 2:** la disminución voluntaria de la ingesta energética *ad libitum*, así como el aumento del gasto de energía, pueden ser la clave que explique porqué las voluntarias no aumentaron de peso a pesar de tomar un aporte extra de energía procedente del chocolate.

La reducción voluntaria de la ingesta estaría avalada por una disminución de la sensación de hambre y apetito por dulce, por una reducción en los valores de cortisol e incluso por la propia composición nutricional del chocolate. En cuanto al gasto energético, el aumento espontáneo de actividad física y la mayor disipación de calor que se observa con la ingesta de chocolate en la condición de noche, podrían contribuir a aumentarlo.

Por otra parte, los resultados sobre el sueño y la siesta también podrían afectar a los efectos metabólicos del chocolate y a la ausencia de aumento de peso. Concretamente hemos obtenido que la ingesta de chocolate en la condición de mañana se asocia de forma significativa con una mayor frecuencia en la siesta.

### 3. Efectos metabólicos inducidos por el consumo de chocolate

Tabla 13: Diferencias en los efectos de la ingesta de chocolate según la hora de consumo y en comparación con la condición de control, sobre el peso corporal, la distribución de la grasa corporal, la ingesta y el gasto energético, la composición y la función de la microbiota intestinal y sobre diferentes variables metabólicas y circadianas.

	Mañana/ Control	Noche/ Control	Noche/ Mañana
<b>Antropometría</b>			
Peso corporal	*	*	*
Circunferencia de cintura	*	*	*
<b>Ingesta de energía</b>			
Cambio en la ingesta de energía <i>ad libitum</i>	↓	Sin efecto	Sin efecto
Cambio en la ingesta de grasa <i>ad libitum</i>	↓	Sin efecto	Sin efecto
Cambio en la ingesta de HC <i>ad libitum</i>	↓	Sin efecto	Sin efecto
Apetito por dulce	↓	↓	Sin efecto
Hambre	Sin efecto	↓	↓
Valores de cortisol	Sin efecto	Sin efecto	↑
<b>Gasto energético</b>			
Actividad física por la noche	Sin efecto	↑	↑
Actividad física durante el día	Sin efecto	↑	
Oxidación de lípidos	↑	Sin efecto	↓
Oxidación de carbohidratos	↓	Sin efecto	↑
Disipación de calor de la piel	Sin efecto	↑	↑
<b>Metabolismo de glucosa</b>			
Glucosa basal (ayunas)	↓	Sin efecto	↑
<b>Microbiota</b>			
<i>Firmicutes</i> ( <i>Uncla_Lachnospiraceae</i> )	Sin efecto	↓	Sin efecto
AGCC (Isobutirato)	Sin efecto	↑	Sin efecto
<b>Variables de sueño y circadianas</b>			
Frecuencia de siesta	↑	Sin efecto	Sin efecto

Todas las variables mostraron resultados significativos en el test ANOVA, excepto las variables antropométricas que no fueron significativas y por tanto no se realizarán análisis post hoc \*. La dirección de la flecha indica aumento o disminución de la primera condición mencionada respecto a la segunda.  $P < 0,05$  prueba post hoc de Fisher.

Los resultados obtenidos del presente trabajo nos permiten afirmar que el chocolate produce diferentes efectos metabólicos según el momento de la ingesta sea por la mañana o por la noche. En la tabla anterior se representa un resumen de todos los efectos metabólicos producidos por el chocolate según la hora de su consumo.

Este es el primer trabajo que demuestra que cuando hablamos de los efectos metabólicos del consumo de chocolate el “cuándo” es importante.

### 3.1 Sobre la oxidación del sustrato

Con el fin de averiguar si se producían diferencias significativas sobre la oxidación de lípidos o carbohidratos tras la ingesta de chocolate, el último día de cada condición se sometió a las voluntarias a una calorimetría indirecta. Como resultado de la misma, podemos concluir, que la hora en la que se consumió el chocolate dio lugar a un cambio del sustrato energético utilizado en condiciones de ayuno y reposo (metabolismo basal). Cuando tomaron el chocolate en la condición de mañana se produjo una mayor oxidación de lípidos, exactamente se produjo un aumento del 25,6%, comparado con la condición de noche. Por el contrario, cuando toman el chocolate en la condición de noche se produjo una mayor oxidación de carbohidratos, exactamente un incremento del 35,35%, en comparación con la condición de mañana.

Estos resultados también pueden estar relacionados con la teobromina y otras metilxantinas presentes en el chocolate que se ha demostrado que aumentan la termogénesis y la oxidación de lípidos (241), y con el contenido en flavonoides (epicatequina o catequina), ya que otros alimentos o bebidas con contenidos similares al chocolate de epicatequina o catequina han mostrado un aumento de la oxidación de grasas (242).

Varios estudios llevados a cabo entre los años 2010 y 2017, han mostrado que la oxidación del sustrato varía según la ingesta dietética de macronutrientes (243-245). Recientemente en un estudio realizado por Volek JS *et al.* en 2015 (57), se ha demostrado que las dietas ricas en grasas promueven la oxidación de lípidos y mejoran el rendimiento en el ejercicio



físico. En la misma línea se ha demostrado que las dietas que tienen proporciones más elevadas de un macronutriente específico, como puede ser grasa o hidratos de carbono, han mostrado una mayor capacidad para oxidar el macronutriente consumido en mayor cantidad (246-248).

Lo interesante de nuestros resultados es que los cambios que apreciamos en la oxidación del sustrato son independientes a la composición de la dieta, y estarían relacionados con el momento de la ingesta.

Un trabajo prospectivo desarrollado por Froidevaux *et al.* en el año 1993 (60), en 10 mujeres obesas a las que sometieron a una dieta de pérdida de peso demostró que las buenas respondedoras a programas de pérdida de peso presentaban tasas de oxidación de lípidos más elevadas que aquellas que experimentaron recaídas y recuperaban el peso perdido. Este estudio además confirmó la gran variabilidad que se produce entre individuos en la recuperación de peso después de una dieta de adelgazamiento, y que esta variabilidad puede explicarse por la diferente capacidad de oxidación de lípidos que existe entre ellos (60).

Anteriormente, en el año 1990, Zurlo *et al.* (249) demostraron que una oxidación reducida de la grasa, que lleve a un equilibrio positivo de la misma, podría ser un factor importante en el desarrollo de la obesidad. Así una oxidación reducida de lípidos se identificaba como el factor más importante (frente a otros factores conductuales y fisiológicos) para la recuperación del peso corporal después de una pérdida de peso exitosa (249).

Si tenemos en cuenta que la menopausia es un período en la vida de la mujer en el que aumenta el riesgo de sobrepeso, inducir **una mayor oxidación de lípidos, como sucede cuando toman chocolate en la condición de mañana, podría resultar muy beneficioso.**

Aunque investigaciones realizadas en años anteriores (1995 y 2004) (250, 251) sobre grupos de población no tradicionales, como son las personas que sufren trastornos de comportamiento alimentario o los comedores nocturnos, no mostraron efectos favorables tras la ingesta de alimentos en momentos previos al sueño. Otros estudios posteriores, desarrollados entre los

años 2011 y 2014 (252-255), mostraron que la ingesta de un alimento rico en un determinado nutriente como podían ser las proteínas o los hidratos de carbonos, en el período nocturno o inmediatamente antes de dormir, desencadenaban resultados fisiológicos favorables.

Así mismo, la oxidación de carbohidratos que induce el chocolate cuando se toma en la condición de noche es acorde con un estudio previo desarrollado en 2016 por Ormsbee *et al.* (256). El objetivo de esta investigación fue examinar los efectos agudos de tomar leche con chocolate antes de dormir en la hidratación, el metabolismo y el rendimiento en la carrera a la mañana siguiente. Para ello 12 mujeres atletas tomaron al azar leche con chocolate o placebo, 30 minutos antes de irse a dormir y entre 7 y 9 horas antes del ejercicio matutino. Los resultados de este trabajo mostraron **que tomar leche con chocolate antes de dormir podía alterar el metabolismo de ejercicio y reposo a la mañana siguiente, favoreciendo la oxidación de carbohidratos**, aunque este efecto no se tradujera en una mejora del rendimiento en la carrera (256).

En conclusión, tomar chocolate en la condición de noche puede aumentar a la mañana siguiente las reservas endógenas de carbohidratos en forma de glucógeno del músculo y el hígado o la concentración de insulina, y debido al espacio reducido que tiene el organismo para almacenar carbohidratos en comparación con grasas, se podría promover la utilización de estos carbohidratos (257).

Por lo tanto, **la ingesta de chocolate por la noche podría ser aconsejable para favorecer el rendimiento al día siguiente durante ejercicios de alta intensidad o ejercicios prolongados**, para evitar el agotamiento del glucógeno hepático y muscular.

**En resumen sobre el objetivo 3:** en relación a los diferentes efectos metabólicos del chocolate podemos concluir diciendo que la ingesta de chocolate en la condición de mañana induce una mayor oxidación de lípidos.

Mientras que el chocolate en la condición de noche, induce una mayor oxidación de carbohidratos que podría ser aconsejable para mejorar el rendimiento al realizar un ejercicio de alta intensidad al día siguiente.

#### **4. Sobre el efecto de la ingesta de chocolate sobre la glucemia**

Considerando los resultados obtenidos en el presente trabajo con respecto a la glucosa, podemos concluir que la ingesta de chocolate en la condición de mañana disminuye de forma significativa la glucosa basal con respecto a la condición sin chocolate, mientras que el chocolate en la condición de noche, comparado igualmente con la condición de control, aumenta los valores de glucosa basal.

Aunque el cacao presenta numerosos compuestos potencialmente bioactivos, los beneficios para la salud asociados a su consumo, probablemente se deban a la presencia de un alto contenido en flavonoides, en concreto a unos derivados de estos llamados flavanoles.

La administración dietética de flavanoles de cacao puede ser una estrategia complementaria efectiva para alivio o prevención del síndrome metabólico, particularmente de la intolerancia a la glucosa. El cacao es generalmente considerado como la fuente de flavanoles más concentrada de la dieta con el mayor potencial antioxidante (258).

La compleja composición del flavanoles del cacao proporciona la capacidad de interactuar con una gran variedad de moléculas, promoviendo numerosas oportunidades para mejorar las enfermedades metabólicas. Estas interacciones principalmente ocurren en el tracto gastrointestinal, donde la concentración de flavanol procedente del cacao es alta, posteriormente debido a su escasa biodisponibilidad esta concentración disminuye (176).

En el año 2016, Strat *et al.* (176) realizaron una revisión de estudios tanto en animales como en humanos, con el objetivo de avanzar en el conocimiento de los mecanismos de acción de los flavanoles del cacao y en el potencial terapéutico de este alimento en el síndrome metabólico. Las conclusiones de esta revisión fueron que los flavanoles del cacao parecen disminuir el síndrome metabólico, y específicamente las alteraciones que se producen en la homeostasis de la glucosa, por varios mecanismos intermedios.

En primer lugar, el cacao podría reducir la liberación de glucosa después de una comida, al ralentizar la digestión de los carbohidratos, inhibiendo las enzimas digestivas y los transportadores de glucosa, y promoviendo un efecto incretinas (176). La probabilidad de que esto suceda aumenta tras la ingesta de una dosis aguda de cacao, y puesto que estos mecanismos tienen lugar preferentemente en el intestino la escasa biodisponibilidad de estas sustancias no actúa como un factor limitante.

En segundo lugar, el consumo crónico de cacao puede conducir a cambios beneficiosos en la microbiota intestinal, como veremos con más detalle en apartados posteriores de esta tesis doctoral, que mejoren la función barrera e impidan la circulación de la endotoxina con el beneficio que esto supone para evitar la respuesta inflamatoria. Los polifenoles son estables a través del tránsito gástrico e intestinal por lo que llegarán al colón intactos y no será tampoco en este caso la biodisponibilidad un factor limitante (176).

Y en tercer lugar los polifenoles del cacao podrían actuar en los tejidos periféricos, mejorando la función de la células  $\beta$  del páncreas y la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético, aunque estos efectos estarían limitados por la escasa biodisponibilidad de los flavanoles (176).

En definitiva, **el chocolate puede mejorar la homeostasis de la glucosa al disminuir la digestión y absorción de carbohidratos en el intestino**. De hecho, se ha demostrado que el cacao disminuye la velocidad y el alcance de la digestión de macronutrientes al unirse y antagonizar las enzimas digestivas (176).

La cuestión que nos planteamos tras los resultados obtenidos en el presente trabajo, es por qué este efecto se produce cuando el chocolate se consume por la mañana y no cuando se toma por la noche.

En este trabajo estamos demostrando que el chocolate es más saludable desde el punto de vista de la prevención de diabetes y en el metabolismo de los carbohidratos cuando su ingesta se produce por la mañana que por la noche. Estos resultados coinciden con estudios previos de nuestro grupo de investigación (112) que muestran que por la mañana el tejido adiposo

presenta una mejor respuesta a la acción de la insulina, es decir que la sensibilidad a la insulina en el tejido adiposo es mayor por la mañana que por la noche, lo que podría ayudar a entender porque una gran cantidad de chocolate como ésta (100g) y un elevado consumo de carbohidratos se tolera mejor por la mañana que por la noche.

Otros resultados de nuestro grupo muestran que el consumo de carbohidratos por la mañana, durante las dos primeras horas al levantarse, tiene un efecto metabólico más favorable que cuando se toma por la noche, durante la dos últimas horas antes de acostarse (92). Todo esto podría relacionarse también con el comportamiento de los ritmos circadianos en nuestro organismo en relación al metabolismo de la glucosa y a la acción de la insulina (259). De hecho se sabe que la insulina en general se secreta mejor por las células  $\beta$  del páncreas por la mañana que por la noche y además que la resistencia a la acción de la insulina después de una carga oral de glucosa elevada es mucho mayor por la noche que por la mañana.

En definitiva todo esto podría ayudar a explicar por qué la ingesta de chocolate por la mañana da lugar a una disminución de la glucemia basal y no es así con la ingesta de chocolate por la noche. Entendemos que gran parte de los estudios realizados, que encuentran una acción beneficiosa del chocolate sobre la glucemia, realizaban la ingesta de chocolate por la mañana, aunque la mayoría de ellos no especifican la hora de ingesta, pero podría ser así y contribuir de esta forma al efecto beneficioso.

En 2017 Ramos *et al.* (260) realizaron una revisión de los estudios más relevantes publicados en la década anterior en cultivos celulares, modelos animales y estudios en humanos. La mayoría de los resultados obtenidos apoyaban un efecto antidiabético en los flavonoides del cacao al mejorar la secreción y sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, ejercer un efecto hipolipemiante y prevenir la oxidación e inflamación, todos ellos procesos considerados como daños asociados a la enfermedad diabética. Si bien se podría sugerir que el consumo diario de flavonoides de cacao o chocolate negro constituiría una herramienta preventiva útil para el tratamiento de la diabetes tipo 2, esta recomendación debe hacerse con gran cautela ya que la

mayoría de los derivados de cacao o chocolates solubles contienen poca cantidad de flavonoides y son ricos en azúcar y calorías que pueden agravar el control glucémico en pacientes con diabetes tipo 2.

De hecho, Strat *et al.* (176) en la revisión comentada previamente, insistieron en la necesidad de realizar nuevas investigaciones en las que se caracterizara el tipo de chocolate y el contenido de la dieta, así como el diseño del experimento, si el consumo de chocolate era agudo o crónico. Estos requerimientos contribuyen a justificar el interés de nuestro trabajo que se realizó con chocolate con leche y con un consumo agudo.

**En resumen sobre el objetivo 4:** Podemos afirmar que el chocolate puede mejorar la homeostasis de la glucosa al enlentecer la digestión y disminuir la absorción de carbohidratos en el intestino.

El hecho de que estudios previos hayan mostrado una mayor sensibilidad del tejido adiposo a la insulina por la mañana que por la noche, y que la insulina en general se secrete mejor por las células  $\beta$  del páncreas por la mañana que por la noche, podrían ayudar a explicar por qué la glucemia disminuye tras 14 días de ingesta de chocolate por la mañana y esto no sucede cuando el chocolate se consume por la noche.

## **5. Sobre los cambios en la composición y función de la microbiota intestinal**

De acuerdo con estudios previos (261, 262), nuestros resultados muestran que la ingesta de chocolate presenta un impacto relevante sobre la composición y diversidad de la microbiota intestinal, con independencia del momento en que se consume. A la vez que se observa un aumento significativo en la variabilidad interindividual de diferentes especies bacterianas tras la ingesta de chocolate, en comparación con la condición en la que no toman chocolate (control).

Durante los últimos años, el microbioma intestinal, se ha convertido en un campo de investigación muy popular. El término microbioma se refiere no sólo al número total de microorganismos sino también a su material genético, mientras el término microbiota hace referencia a la población microbiana presente en los diferentes ecosistemas del organismo.

Se sabe, que las comunidades microbianas comensales del aparato digestivo humano constituyen un conjunto diverso y complejo y que tienen un impacto significativo sobre la salud humana. Se cree además, que la dieta juega un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de una microbiota intestinal saludable (168, 169). Además, se han establecido vínculos entre la composición de la microbiota y el riesgo de presentar obesidad o síndrome metabólico (169).

La importancia de la microbiota radica en su función, algunas especies bacterianas están relacionadas con la producción de ácidos grasos de cadena corta, que mejoran el estado de la mucosa en el colón y la función barrera intestinal (174, 175). Es posible que el chocolate pueda modular las actividades de ciertas especies microbianas en el intestino.

Por otra parte, el chocolate es considerado un compuesto prebiótico por ser rico en polifenoles, de entre los cuales destacan los flavanoles (263). Nos referimos a prebióticos cuando hablamos de ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de manera beneficiosa al huésped estimulando de forma selectiva el número o actividad de un número limitado de especies bacterianas que ya residen en el tracto intestinal (177). La elevada proporción de flavanoles



presentes en el cacao interactúa con la microbiota intestinal en el colón. Se produce un efecto bidireccional, por una parte la microbiota intestinal metaboliza los polifenoles, y por otra, estos polifenoles modulan la microbiota del colón aumentando el número de bacterias y cambiando así la composición de la microbiota lo cual favorece la salud del huésped (177). Este sería el mecanismo que explica cómo los flavanoles pueden actuar como prebióticos (264).

Nuestros resultados tras la ingesta de chocolate con leche en comparación con la condición en la que no se tomó chocolate (N), muestran una reducción en la abundancia relativa de *Firmicutes*, en particular del género *Lachnospiraceae*. Por otra parte, y en contra de lo esperado, tras la ingesta de chocolate se observa una tendencia a la disminución de la diversidad microbiana determinada mediante el índice de Simpson inverso.

Estos resultados están relacionados con los obtenidos en estudios científicos previos (264, 265), en los que se asoció la ingesta de chocolate negro con la inhibición de posibles bacterias nocivas como son las del grupo *Clostridium* (*Firmicutes phylum*). Este es el caso de un ensayo clínico desarrollado en el año 2011 por Tzounis *et al.* (264), cuyo diseño fue aleatorio, controlado y doble ciego. En este estudio, los investigadores compararon los resultados de consumir bebidas con alto contenido en cacao (ricas en flavanoles), frente a otras bebidas con bajo contenido en flavanoles. Sus resultados cuando se tomaron las bebidas de cacao mostraron una disminución significativa en *Clostridium* (*Firmicutes phylum*) (264).

Además, en nuestro trabajo observamos también que la ingesta de chocolate con leche aumentó la abundancia de los géneros: *Ruminococcus* y *Dorea*, entre otros. Aunque la significación se perdió al ajustar por el valor inicial de la primera condición.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que los valores de *Ruminococcus* aumentaron después del consumo de un alimento rico en carbohidratos como es el chocolate con leche (60 g de carbohidratos y 2 g de fibra).

Estos resultados son compatibles con estudios preliminares, como se demuestra en una revisión sistemática de la literatura existente que se realizó en 2015 por Ranisk K Singh *et al.* (266), y que fue publicada en 2017. Se estudiaron 188 artículos y se evaluó exhaustivamente la capacidad de la dieta del huésped para modular las bacterias intestinales. Singh y colaboradores demostraron que el consumo de determinados tipos de alimentos producía cambios predecibles en los géneros bacterianos que colonizan a los hospedadores (266). Concretamente, respecto a *Ruminococcus*, mostraron valores elevados de esta bacteria después del consumo de dietas altas en carbohidratos con oligosacáridos complejos no digeribles (fibras) (266).

### 5.1 Función de la microbiota

En el presente trabajo hemos demostrado además, que el consumo de chocolate en la condición de noche, dio lugar a un aumento en la producción de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC) como son, acetato, propionato y otros ácidos grasos menores (isobutirato, isovaleronato y valeronato), en comparación con la condición en la que no toman chocolate (control). Sin embargo, los valores de AGCC tras tomar el chocolate en la condición de mañana, aunque aumentaron, no llegaron a alcanzar a los de la condición de noche.

Recientemente, en un trabajo realizado por Arumugan *et al.* (267) se ha demostrado que la microbiota intestinal puede subdividirse en diferentes enterotipos, cada uno compuesto por géneros bacterianos específicos, pero todos parecen compartir una alta uniformidad funcional. Kurokawa I *et al.* (268) en 2007, para identificar las características genómicas comunes a todos los microbiomas intestinales humanos, así como las diferencias entre ellos, realizaron un análisis metagenómico comparativo a gran escala de muestras fecales. Las muestras procedían de 13 individuos sanos de diversas edades, incluyendo bebés no destetados. Los autores encontraron, que mientras la microbiota intestinal de los bebés no destetados era simple y mostraba una alta variación interindividual en la composición taxonómica y genética, la de los adultos y niños destetados era más compleja pero mostraba una alta

uniformidad funcional. Esta uniformidad se produjo con independencia de características del huésped, tales como la edad, el sexo, el índice de masa corporal o la nacionalidad (268).

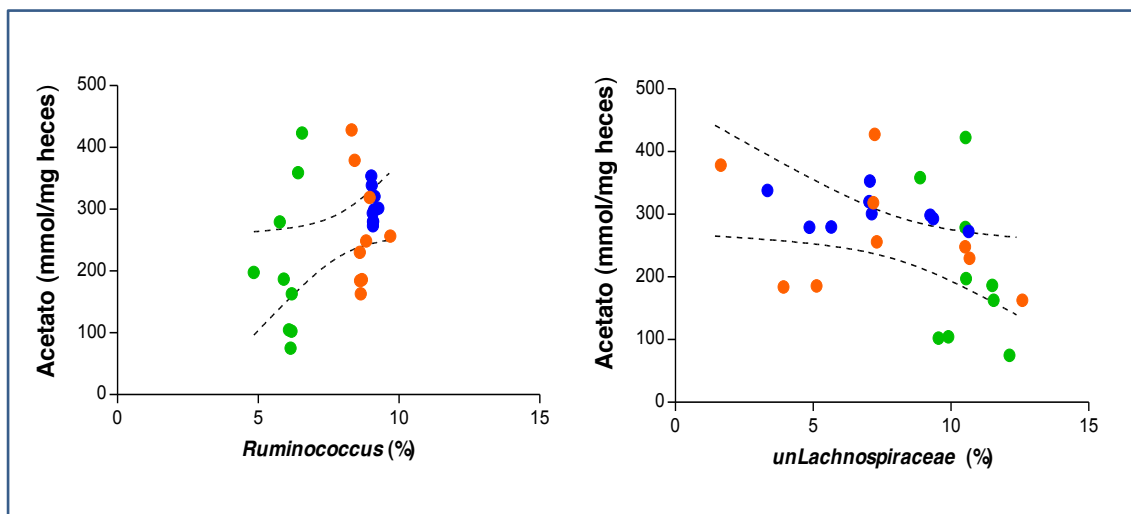
Es sabido que la presencia de bacterias en el intestino distal contribuye a la salud del huésped a través de la biosíntesis de vitaminas y aminoácidos esenciales. Y también con la generación de subproductos metabólicos de componentes dietéticos no digeridos por el intestino delgado (269). Algunos de estos subproductos como los Ácidos Grasos de Cadena Corta (SAGCC) tales como **butirato, propionato y acetato**, actúan como una importante fente de energía para las células epiteliales intestinales y, por lo tanto, pueden fortalecer la barrera de la mucosa intestinal (270).

Se sabe que las modificaciones en el perfil de la microbiota intestinal pueden cambiar su actividad metabólica produciendo y liberando diferentes cantidades de AGCC en la luz intestinal. Esto podría explicar alguno de los resultados de nuestro experimento, como que las voluntarias presenten una sensación de hambre y de apetito por dulce significativamente más baja cuando toman chocolate en la condición de noche.

De hecho, los AGCC más abundantes, es decir, acetato, propionato y butirato, se han asociado directamente con la regulación central del apetito, por cambios en los perfiles de expresión de las hormonas anorexigénicas que favorecen la supresión del apetito (271, 272). En particular se ha visto, que acetato y butirato podrían **participar en la regulación del apetito** mediante la secreción por las células L del íleon y del colon de hormonas estimulantes de la saciedad como son el Péptido YY (PYY) y el péptido similar a glucagón 1 (GLP-1) (271).

Por otra parte en una investigación en ratones, desarrollada por Frost *et al.* en 2014 (273), en la que se llevó a cabo una administración intraperitoneal de acetato, se produjo una disminución aguda de la ingesta de alimentos a través de la supresión del apetito. Por lo que se concluyó que el acetato también podría ser un regulador del apetito a través de un mecanismo homeostático central (273).

En nuestro trabajo, el efecto beneficioso de la ingesta de chocolate está apoyado por el aumento de los valores de *Ruminococcus*, que se asocia con valores elevados de acetato. Por otra parte el descenso observado de los valores del género *Lachnospiraceae*, asociado con una reducción de acetato, podría contribuir también a este efecto beneficioso del chocolate (Figura 17).



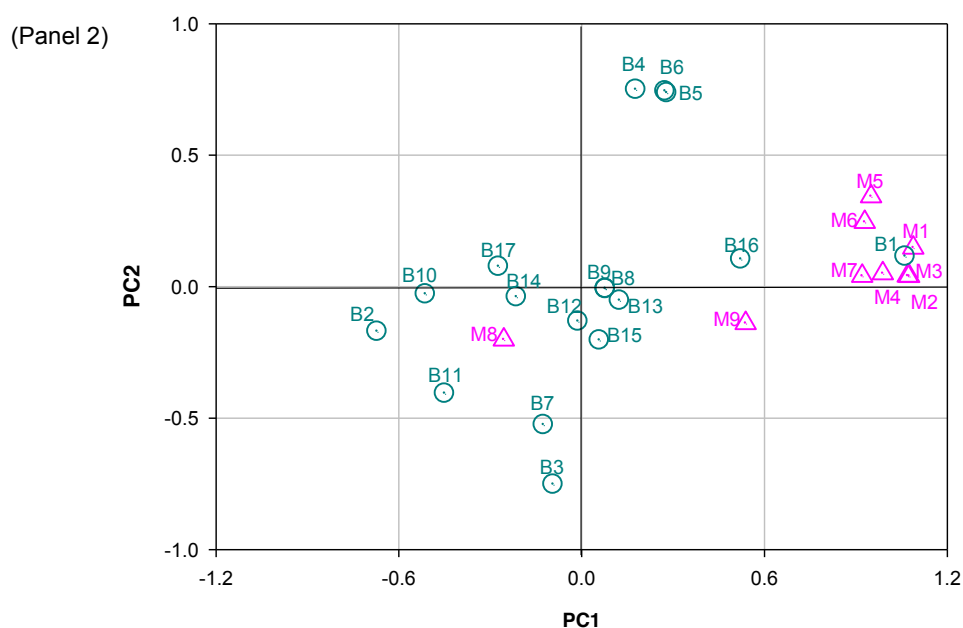
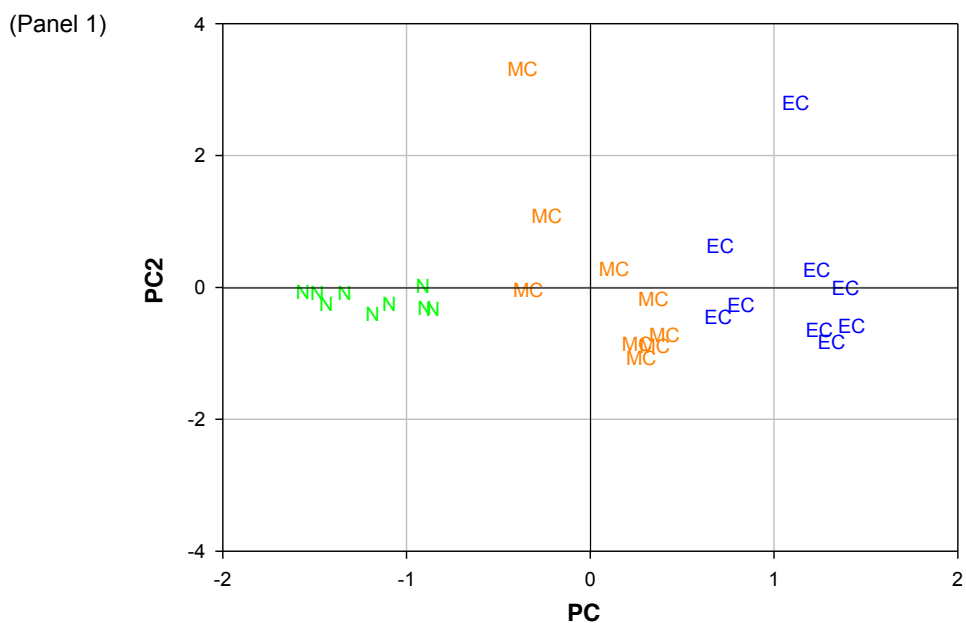
**Figura 17:** Asociaciones entre los géneros *Ruminococcus* y *Lachnospiraceae* y los valores de acetato en las muestras fecales. Correlaciones específicas de SCFA de Pearson con valores ajustados por *baseline*. N (Control, sin chocolate en verde), CE (chocolate en la Noche / noche en azul) y MC (chocolate en la Mañana en naranja). Las líneas representan líneas de regresión lineal y las áreas sombreadas muestran el intervalo de confianza del 95%.

## 5.2 Asociación entre composición y función de la microbiota

Conocidos los efectos del chocolate con leche sobre la composición y función de la microbiota, hemos tratado de comprender las complejas asociaciones entre la composición y la actividad microbiana. Llegando a una conclusión, y es que la ingesta de chocolate, y lo que es más importante, el horario de la ingesta de chocolate, da como resultado perfiles y funciones de microbiota diferenciados.

Estas diferencias fueron marcadas principalmente por metabolitos bacterianos (AGCC) producidos por la microbiota intestinal lo cual indica que los AGCC podrían ser un buen biomarcador para explicar, al menos en parte, las diferencias encontradas entre las diferentes condiciones objeto de estudio.

En el análisis que hemos realizado de componentes principales (**Figura 18**) *Ruminococcus* aparece en el tercer factor, junto con la relación acetato:propionato, lo cual es compatible con la correlación positiva y significativa encontrada entre la abundancia de *Ruminococcus* y los valores elevados de acetato.



**Figura 18:** Análisis de componentes principales correspondientes a los datos de grupos bacterianos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC). **Panel 1:** Distribución en las diferentes condiciones: Control sin chocolate en verde, N; chocolate por la noche en azul, EC; y chocolate a la mañana en naranja, MC. **Panel 2:** Variables en el primer (PC1) y el segundo componente (PC2) representados de acuerdo con su factor de carga. Valeronato, M1; Isovaleronato, M2; Otros SCFA menores, M3; SCFA totales, M4; Isobutirato, M5; Propionato, M6; Butirato, M7; Relación acetato: propionato, M8; Acetato, M9; *Methanobacteriaceae*, B1; *Akkermansia*, B2; *Firmicutes*, B3; *Adlercreutzia*, B4; *Methanobrevibacter*, B5; *Peptostreptococcaceae*, B6; Invsimpson, B7; *Streptococcaceae*, B8; *Ruminococcus*, B9; *Faecalibacterium*, B10; *Dorea*, B11; *Clostridiaceae*, B12; *Streptococcus*, B13; *Verrucomicrobiaceae*, B14; *UnLachnospiraceae*, B15; *UnClostridiaceae*, B16; *Eubacterium*, B17.

Además de los efectos sobre el apetito, diferentes estudios relacionados con AGCC, especialmente con el butirato, muestran implicaciones beneficiosas en la permeabilidad intestinal (271). En este sentido, se ha demostrado que los AGCC mejoran la barrera intestinal, induciendo cambios hacia una menor permeabilidad intestinal, al modular la expresión de mucinas y proteínas de unión estrecha (47, 274).

**En resumen sobre el objetivo 5:** podemos decir que la ingesta de chocolate, independientemente de la hora en que se tome, afecta a la composición y diversidad de la microbiota intestinal, y se produce además un aumento significativo en la variabilidad interindividual.

Nuestros resultados, tras la ingesta de chocolate con leche en comparación con la condición en la que no tomaron chocolate, muestran un aumento en la abundancia de los géneros *Ruminococcus* y *Dorea*. Por el contrario se produce una reducción en la abundancia relativa de *Firmicutes*, en el género *Lachnospiraceae* y en contra de lo esperado el consumo de chocolate disminuyó la diversidad microbiana calculada mediante el índice de Simpson inverso.

Así pues, hemos observado que la ingesta de chocolate en la condición de noche dio lugar a un aumento en la producción de Ácidos Grasos de Cadena Corta (AGCC) como acetato, propionato y otros ácidos grasos menores (isobutirato, isovaleronato y valeronato). Algunos de ellos, como butirato, propionato y acetato actúan como fuente de energía importante para las células epiteliales intestinales y, por lo tanto, pueden fortalecer la barrera mucosa intestinal. Además podrían ayudar a explicar la disminución en la sensación de hambre y apetito por dulce que refieren las participantes ya que algunos de estos AGCC se han asociado directamente con la regulación central del apetito.

Finalmente, al analizar las asociaciones entre la composición y la actividad microbiana, llegamos a una conclusión, y es que la ingesta de chocolate, y lo que es más importante el horario de la ingesta de chocolate, da como resultado perfiles y funciones de microbiota diferenciados. En concreto hemos encontrado una correlación positiva y significativa entre los valores de *Ruminococcus* y acetato, la cual apoya el efecto beneficioso de la ingesta de chocolate.





# CONCLUSIONES

---



1. La ingesta de 100 g de chocolate con leche durante 14 días de intervención por la mañana y por la noche, no afecta de forma significativa al peso corporal, al IMC, ni al porcentaje de grasa corporal.
  
2. La disminución de la ingesta energética, el aumento del gasto de energía, la mayor regularidad del sueño y el aumento de la frecuencia de la siesta, pueden contribuir a explicar por qué las voluntarias no aumentaron de peso corporal a pesar del elevado consumo de chocolate.
  - 2.a. La reducción de la ingesta de otros alimentos de la dieta tras el consumo de chocolate se explica en parte por la disminución de la sensación de hambre y apetito por dulce, que podría estar fomentada por la disminución del cortisol o por la composición del chocolate con elevado contenido en grasa y azúcares, y en polifenoles y metilxantinas.
  - 2.b. El aumento del gasto energético producido por la ingesta de chocolate por la noche se produce por incremento de la actividad física y la mayor disipación de calor, en especial tras las comidas.
  - 2.c. La ingesta de chocolate en la condición de noche produce una mejora en la regularidad del sueño, mientras que el chocolate en la condición de mañana se asocia con una mayor frecuencia de siesta.
  
3. Tras analizar los efectos metabólicos inducidos por la ingesta de chocolate, afirmamos que el chocolate en la condición de mañana promueve una mayor oxidación de lípidos. Mientras que el chocolate en la condición de noche induce una mayor oxidación de carbohidratos.
  
4. La ingesta de chocolate con leche durante la primera hora de la mañana disminuye la glucemia basal. Resultado que no se replicó cuando la ingesta de chocolate tuvo lugar en la condición de noche.

5. La ingesta de chocolate, y lo que es más importante el horario de la ingesta de chocolate, da como resultado perfiles y funciones de microbiota diferenciados.

### **Recomendación final**

La ingesta de una cantidad elevada de chocolate (100 g) concentrada en una ventana de tiempo estrecha (1 h) por la mañana, podría ser recomendable en mujeres postmenopáusicas para favorecer la movilización de la grasa corporal y disminuir los valores de glucosa. Mientras que el consumo de chocolate por la noche se podría recomendar en deportistas para una mayor disposición de carbohidratos como sustrato energético durante la mañana siguiente, en el caso que vayan a realizar ejercicio intenso o prolongado.

# BIBLIOGRAFÍA

---



1. Veronese N, Demurtas J, Celotto S, Caruso MG, Maggi S, Bolzetta F, et al. Is chocolate consumption associated with health outcomes? An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Clin Nutr.* 2019;38(3):1101-8. Epub 2018/06/16.
2. Torres-Moreno M, Torrescasana E, Salas-Salvado J, Blanch C. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chem.* 2015;166:125-32. Epub 2014/07/24.
3. Rusconi M, Conti A. Theobroma cacao L., the Food of the Gods: a scientific approach beyond myths and claims. *Pharmacological research.* 2010;61(1):5-13. Epub 2009/09/09.
4. Verna R. The history and science of chocolate. *The Malaysian journal of pathology.* 2013;35(2):111-21. Epub 2013/12/24.
5. Tuenter E, Foubert K, Pieters L. Mood Components in Cocoa and Chocolate: The Mood Pyramid. *Planta medica.* 2018;84(12-13):839-44. Epub 2018/03/15.
6. Seligson FH, Krummel DA, Apgar JL. Patterns of chocolate consumption. *The American journal of clinical nutrition.* 1994;60(6 Suppl):1060S-4S. Epub 1994/12/01.
7. Montagna MT, Diella G, Triggiano F, Caponio GR, De Giglio O, Caggiano G, et al. Chocolate, "Food of the Gods": History, Science, and Human Health. *International journal of environmental research and public health.* 2019;16(24). Epub 2019/12/11.
8. Dillinger TL, Barriga P, Escarcega S, Jimenez M, Salazar Lowe D, Grivetti LE. Food of the gods: cure for humanity? A cultural history of the medicinal and ritual use of chocolate. *The Journal of nutrition.* 2000;130(8S Suppl):2057S-72S. Epub 2000/08/05.
9. Beckett ST. Science of Chocolate || The history of chocolate. 2000;10.1039/97.
10. Schulte EM, Avena NM, Gearhardt AN. Which foods may be addictive? The roles of processing, fat content, and glycemic load. *PloS one.* 2015;10(2):e0117959. Epub 2015/02/19.
11. Macht M, Dettmer D. Everyday mood and emotions after eating a chocolate bar or an apple. *Appetite.* 2006;46(3):332-6. Epub 2006/03/21.
12. Meier BP, Noll SW, Molokwu OJ. The sweet life: The effect of mindful chocolate consumption on mood. *Appetite.* 2017;108:21-7. Epub 2016/11/05.
13. Nickless H. Cocoa butter quality. *Proceeding of the Malaysian international cocoa conference Kuala Lumpur.* 1996(In: Selamat J, Lian BC, Lai TK, Ishak WRW, 478 Mansor M (eds)):322-66.
14. Khampuis HJ. Production and quality standards of cocoa mass, cocoa butter and cocoa powder. *Industrial chocolate manufacture and use Oxford: Wiley-Blackwell 2010* (In S. T. Beckett (Ed.)): (pp. 121-41).
15. M. Lipp EA. Review of cocoa butter and alternative fats for use in chocolate—Part A. Compositional data. *Food Chemistry.* 1998;62(1):73-97.
16. Vinson JA, Proch J, Zubik L. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: cocoa, dark chocolate, and milk chocolate. *Journal of agricultural and food chemistry.* 1999;47(12):4821-4. Epub 1999/12/22.
17. Bonanome A, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *The New England journal of medicine.* 1988;318(19):1244-8. Epub 1988/05/12.
18. Derr J, Kris-Etherton PM, Pearson TA, Seligson FH. The role of fatty acid saturation on plasma lipids, lipoproteins, and apolipoproteins: II. The plasma total and low-density lipoprotein cholesterol response of individual fatty acids. *Metabolism: clinical and experimental.* 1993;42(1):130-4. Epub 1993/01/01.
19. Kris-Etherton PM, Derr JA, Mustad VA, Seligson FH, Pearson TA. Effects of a milk chocolate bar per day substituted for a high-carbohydrate snack in young men on an NCEP/AHA Step 1 Diet. *The American journal of clinical nutrition.* 1994;60(6 Suppl):1037S-42S. Epub 1994/12/01.
20. Kris-Etherton PM, Pearson TA, Wan Y, Hargrove RL, Moriarty K, Fishell V, et al. High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol

concentrations. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(6):1009-15. Epub 1999/12/03.

21. Wan Y, Vinson JA, Etherton TD, Proch J, Lazarus SA, Kris-Etherton PM. Effects of cocoa powder and dark chocolate on LDL oxidative susceptibility and prostaglandin concentrations in humans. *The American journal of clinical nutrition*. 2001;74(5):596-602. Epub 2001/10/31.

22. Mursu J, Voutilainen S, Nurmi T, Rissanen TH, Virtanen JK, Kaikkonen J, et al. Dark chocolate consumption increases HDL cholesterol concentration and chocolate fatty acids may inhibit lipid peroxidation in healthy humans. *Free radical biology & medicine*. 2004;37(9):1351-9. Epub 2004/09/30.

23. Beckett ST. *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. Oxford: Blackwell Science. 1999.

24. Hannum SM, Schmitz HH, Keen CL. Chocolate: A Heart-healthy Food? Show Me the Science! *Nutrition today*. 2002;37(3):103-9. Epub 2002/07/20.

25. Oldham KM, Bowen PE. Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial? *J Am Diet Assoc*. 1998;98(9):1001-8. Epub 1998/09/18.

26. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408(6809):239-47. Epub 2000/11/23.

27. Valenzuela B Alfonso SJ, Nieto Susana. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Grasas y aceites*. 2003;Vol. 54. :295-303.

28. Keen CL, Holt RR, Oteiza PI, Fraga CG, Schmitz HH. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(1 Suppl):298S-303S. Epub 2005/01/11.

29. Selmi C, Cocchi CA, Lanfredini M, Keen CL, Gershwin ME. Chocolate at heart: the anti-inflammatory impact of cocoa flavanols. *Molecular nutrition & food research*. 2008;52(11):1340-8. Epub 2008/11/11.

30. Larsson SC, Virtamo J, Wolk A. Chocolate consumption and risk of stroke: a prospective cohort of men and meta-analysis. *Neurology*. 2012;79(12):1223-9.

31. Wollgast J, Anklam E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*. 2000;33(6):449-59.

32. Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(3):611-4. Epub 2005/03/10.

33. Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Archives of internal medicine*. 1996;156(6):637-42. Epub 1996/03/25.

34. Sarabia JA, Rol MA, Mendiola P, Madrid JA. Circadian rhythm of wrist temperature in normal-living subjects A candidate of new index of the circadian system. *Physiology & behavior*. 2008;95(4):570-80. Epub 2008/09/02.

35. Dreosti IE. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. *Nutrition*. 2000;16(7-8):692-4. Epub 2000/07/25.

36. Crozier SJ, Preston AG, Hurst JW, Payne MJ, Mann J, Hainly L, et al. Cacao seeds are a "Super Fruit": A comparative analysis of various fruit powders and products. *Chemistry Central journal*. 2011;5:5. Epub 2011/02/09.

37. Miller KB, Hurst WJ, Flannigan N, Ou B, Lee CY, Smith N, et al. Survey of commercially available chocolate- and cocoa-containing products in the United States. 2. Comparison of flavan-3-ol content with nonfat cocoa solids, total polyphenols, and percent cacao. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(19):9169-80. Epub 2009/09/17.

38. Corti R, Flammer AJ, Hollenberg NK, Luscher TF. Cocoa and cardiovascular health. *Circulation*. 2009;119(10):1433-41. Epub 2009/03/18.



39. Cooper KA, Donovan JL, Waterhouse AL, Williamson G. Cocoa and health: a decade of research. *The British journal of nutrition*. 2008;99(1):1-11. Epub 2007/08/02.
40. Steinberg F, Bearden, M., & Keen, C. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association*. 2003;103:215-23.
41. Mostofsky E, Levitan EB, Wolk A, Mittelman MA. Chocolate intake and incidence of heart failure: a population-based prospective study of middle-aged and elderly women. *Circulation Heart failure*. 2010;3(5):612-6. Epub 2010/08/18.
42. España. RMICCM. Neurobiología de las metilxantinas. *Revista transtornos adictivos*. 2008;10, Num 3:201-7.
43. Sanchez J, Perez-Heredia F, Priego T, Portillo MP, Zamora S, Garaulet M, et al. Dehydroepiandrosterone prevents age-associated alterations, increasing insulin sensitivity. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2008;19(12):809-18. Epub 2008/05/17.
44. Straczkowski M, Kowalska I, Nikolajuk A, Dzieńis-Straczkowska S, Kinalska I, Baranowski M, et al. Relationship between insulin sensitivity and sphingomyelin signaling pathway in human skeletal muscle. *Diabetes*. 2004;53(5):1215-21. Epub 2004/04/28.
45. Bousserouel S, Brouillet A, Bereziat G, Raymondjean M, Andreani M. Different effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on the activation of rat smooth muscle cells by interleukin-1 beta. *Journal of lipid research*. 2003;44(3):601-11. Epub 2003/02/04.
46. Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Lehert P, Burger HG. The menopausal transition: a 9-year prospective population-based study. The Melbourne Women's Midlife Health Project. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2004;7(4):375-89. Epub 2005/04/01.
47. Lopez KN, Knudson JD. Obesity: from the agricultural revolution to the contemporary pediatric epidemic. *Congenital heart disease*. 2012;7(2):189-99. Epub 2012/02/07.
48. Wolf OT, Koster B, Kirschbaum C, Pietrowsky R, Kern W, Hellhammer DH, et al. A single administration of dehydroepiandrosterone does not enhance memory performance in young healthy adults, but immediately reduces cortisol levels. *Biol Psychiatry*. 1997;42(9):845-8. Epub 1997/11/05.
49. Phillips AC, Carroll D, Gale CR, Lord JM, Arlt W, Batty GD. Cortisol, DHEAS, their ratio and the metabolic syndrome: evidence from the Vietnam Experience Study. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2010;162(5):919-23. Epub 2010/02/19.
50. Tucker LA, Kano MJ. Dietary fat and body fat: a multivariate study of 205 adult females. *The American journal of clinical nutrition*. 1992;56(4):616-22. Epub 1992/10/01.
51. Fricker J, Fumeron F, Clair D, Apfelbaum M. A positive correlation between energy intake and body mass index in a population of 1312 overweight subjects. *Int J Obes*. 1989;13(5):673-81. Epub 1989/01/01.
52. Heini AF, Weinsier RL. Divergent trends in obesity and fat intake patterns: the American paradox. *The American journal of medicine*. 1997;102(3):259-64. Epub 1997/03/01.
53. Howell S, Kones R. "Calories in, calories out" and macronutrient intake: the hope, hype, and science of calories. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2017;313(5):E608-E12. Epub 2017/08/03.
54. Haugen HA, Chan LN, Li F. Indirect calorimetry: a practical guide for clinicians. *Nutrition in clinical practice : official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*. 2007;22(4):377-88. Epub 2007/07/24.
55. Achten J, Jeukendrup AE. Optimizing fat oxidation through exercise and diet. *Nutrition*. 2004;20(7-8):716-27. Epub 2004/06/24.
56. Venables MC, Achten J, Jeukendrup AE. Determinants of fat oxidation during exercise in healthy men and women: a cross-sectional study. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;98(1):160-7. Epub 2004/08/31.

57. Volek JS, Noakes T, Phinney SD. Rethinking fat as a fuel for endurance exercise. *Eur J Sport Sci.* 2015;15(1):13-20. Epub 2014/10/03.
58. Brooks GA, Mercier J. Balance of carbohydrate and lipid utilization during exercise: the "crossover" concept. *J Appl Physiol* (1985). 1994;76(6):2253-61. Epub 1994/06/01.
59. Achten J, Gleeson M, Jeukendrup AE. Determination of the exercise intensity that elicits maximal fat oxidation. *Medicine and science in sports and exercise.* 2002;34(1):92-7. Epub 2002/01/10.
60. Froidevaux F, Schutz Y, Christin L, Jequier E. Energy expenditure in obese women before and during weight loss, after refeeding, and in the weight-relapse period. *The American journal of clinical nutrition.* 1993;57(1):35-42. Epub 1993/01/01.
61. Craig CL, Marshall AL, Sjoström M, Bauman AE, Booth ML, Ainsworth BE, et al. International physical activity questionnaire: 12-country reliability and validity. *Medicine and science in sports and exercise.* 2003;35(8):1381-95. Epub 2003/08/06.
62. Roman-Viñas B et al. International physical activity questionnaire: reliability and validity in a Spanish population. *European Journal of Sport Science* 2010;10(5):297-304.
63. Rutten A, Vuillemin A, Ooijendijk WT, Schena F, Sjoström M, Stahl T, et al. Physical activity monitoring in Europe. The European Physical Activity Surveillance System (EUPASS) approach and indicator testing. *Public health nutrition.* 2003;6(4):377-84. Epub 2003/06/11.
64. Greenberg JA, Manson JE, Buijsse B, Wang L, Allison MA, Neuhauser ML, et al. Chocolate-candy consumption and 3-year weight gain among postmenopausal U.S. women. *Obesity (Silver Spring).* 2015;23(3):677-83. Epub 2015/02/04.
65. Greenberg JA, Buijsse B. Habitual chocolate consumption may increase body weight in a dose-response manner. *PLoS one.* 2013;8(8):e70271. Epub 2013/08/21.
66. Tey SL, Brown RC, Gray AR, Chisholm AW, Delahunty CM. Long-term consumption of high energy-dense snack foods on sensory-specific satiety and intake. *The American journal of clinical nutrition.* 2012;95(5):1038-47. Epub 2012/04/12.
67. González-Sarrías Antonio EC, Paula Pinto, Pedro Mena, Margherita Dall'Asta, Mar Garcia-Aloy, Ana Rodríguez-Mateos, Eileen R. Gibney, Julie Dumont, Marika Massaro, Julio Sánchez-Meca, Christine Morand, and María-Teresa García-Conesa<sup>1,\*</sup>. A Systematic Review and Meta-Analysis of the Effects of Flavanol-Containing Tea, Cocoa and Apple Products on Body Composition and Blood Lipids: Exploring the Factors Responsible for Variability in Their Efficacy. *Nutrients.* 2017;9(7).
68. Gonzalez-Sarrias A, Nunez-Sanchez MA, Tomas-Barberan FA, Espin JC. Neuroprotective Effects of Bioavailable Polyphenol-Derived Metabolites against Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2017;65(4):752-8. Epub 2017/02/02.
69. Kord-Varkaneh H, Ghaedi E, Nazary-Vanani A, Mohammadi H, Shab-Bidar S. Does cocoa/dark chocolate supplementation have favorable effect on body weight, body mass index and waist circumference? A systematic review, meta-analysis and dose-response of randomized clinical trials. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2018:1-14. Epub 2018/03/20.
70. Muniyappa R, Hall G, Kolodziej TL, Karne RJ, Crandon SK, Quon MJ. Cocoa consumption for 2 wk enhances insulin-mediated vasodilatation without improving blood pressure or insulin resistance in essential hypertension. *The American journal of clinical nutrition.* 2008;88(6):1685-96. Epub 2008/12/10.
71. West SG, McIntyre MD, Piotrowski MJ, Poupin N, Miller DL, Preston AG, et al. Effects of dark chocolate and cocoa consumption on endothelial function and arterial stiffness in overweight adults. *The British journal of nutrition.* 2014;111(4):653-61. Epub 2013/11/28.
72. Yoon HS, Kim JR, Park GY, Kim JE, Lee DH, Lee KW, et al. Cocoa Flavanol Supplementation Influences Skin Conditions of Photo-Aged Women: A 24-Week Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. *The Journal of nutrition.* 2016;146(1):46-50. Epub 2015/11/20.

73. Nickols-Richardson SM, Piehowski KE, Metzgar CJ, Miller DL, Preston AG. Changes in body weight, blood pressure and selected metabolic biomarkers with an energy-restricted diet including twice daily sweet snacks and once daily sugar-free beverage. *Nutrition research and practice*. 2014;8(6):695-704. Epub 2014/12/10.
74. Gu Y, Yu S, Lambert JD. Dietary cocoa ameliorates obesity-related inflammation in high fat-fed mice. *European journal of nutrition*. 2014;53(1):149-58. Epub 2013/03/16.
75. Mellor DD, Sathyapalan T, Kilpatrick ES, Atkin SL. Diabetes and chocolate: friend or foe? *Journal of agricultural and food chemistry*. 2015;63(45):9910-8. Epub 2015/03/17.
76. Fraga CG. Cocoa, diabetes, and hypertension: should we eat more chocolate? *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(3):541-2. Epub 2005/03/10.
77. Grassi D, Desideri G, Ferri C. Protective effects of dark chocolate on endothelial function and diabetes. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2013;16(6):662-8. Epub 2013/10/09.
78. Taubert D, Roesen R, Schomig E. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Archives of internal medicine*. 2007;167(7):626-34. Epub 2007/04/11.
79. Ding EL, Hutfless SM, Ding X, Girotra S. Chocolate and prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *Nutrition & metabolism*. 2006;3:2. Epub 2006/01/05.
80. Ried K, Sullivan T, Fakler P, Frank OR, Stocks NP. Does chocolate reduce blood pressure? A meta-analysis. *BMC medicine*. 2010;8:39. Epub 2010/06/30.
81. Desch S, Schmidt J, Kobler D, Sonnabend M, Eitel I, Sareban M, et al. Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. *American journal of hypertension*. 2010;23(1):97-103. Epub 2009/11/17.
82. Shrimme MG, Bauer SR, McDonald AC, Chowdhury NH, Coltart CE, Ding EL. Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a meta-analysis of short-term studies. *The Journal of nutrition*. 2011;141(11):1982-8. Epub 2011/10/01.
83. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, Rimm EB, et al. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American journal of clinical nutrition*. 2012;95(3):740-51. Epub 2012/02/04.
84. Williamson G, Manach C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;81(1 Suppl):243S-55S. Epub 2005/01/11.
85. Curtis PJ, Sampson M, Potter J, Dhatariya K, Kroon PA, Cassidy A. Chronic ingestion of flavan-3-ols and isoflavones improves insulin sensitivity and lipoprotein status and attenuates estimated 10-year CVD risk in medicated postmenopausal women with type 2 diabetes: a 1-year, double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes care*. 2012;35(2):226-32. Epub 2012/01/18.
86. Curtis PJ, Potter J, Kroon PA, Wilson P, Dhatariya K, Sampson M, et al. Vascular function and atherosclerosis progression after 1 y of flavonoid intake in statin-treated postmenopausal women with type 2 diabetes: a double-blind randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2013;97(5):936-42. Epub 2013/04/05.
87. Mellor DD, Sathyapalan T, Kilpatrick ES, Beckett S, Atkin SL. High-cocoa polyphenol-rich chocolate improves HDL cholesterol in Type 2 diabetes patients. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2010;27(11):1318-21. Epub 2010/10/26.
88. Mellor DD, Madden LA, Smith KA, Kilpatrick ES, Atkin SL. High-polyphenol chocolate reduces endothelial dysfunction and oxidative stress during acute transient hyperglycaemia in Type 2 diabetes: a pilot randomized controlled trial. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*. 2013;30(4):478-83. Epub 2012/10/09.
89. Wang JB, Patterson RE, Ang A, Emond JA, Shetty N, Arab L. Timing of energy intake during the day is associated with the risk of obesity in adults. *Journal of human nutrition and*

dietetics : the official journal of the British Dietetic Association. 2014;27 Suppl 2:255-62. Epub 2013/07/03.

90. Berteus Forslund H, Lindroos AK, Sjostrom L, Lissner L. Meal patterns and obesity in Swedish women-a simple instrument describing usual meal types, frequency and temporal distribution. *European journal of clinical nutrition*. 2002;56(8):740-7. Epub 2002/07/18.

91. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. *Cell metabolism*. 2012;15(6):848-60. Epub 2012/05/23.

92. Arble DM, Bass J, Laposky AD, Vitaterna MH, Turek FW. Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(11):2100-2. Epub 2009/09/05.

93. Baron KG, Reid KJ, Horn LV, Zee PC. Contribution of evening macronutrient intake to total caloric intake and body mass index. *Appetite*. 2013;60(1):246-51. Epub 2012/10/06.

94. Colles SL, Dixon JB, O'Brien PE. Night eating syndrome and nocturnal snacking: association with obesity, binge eating and psychological distress. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(11):1722-30. Epub 2007/06/21.

95. Baron KG, Reid KJ, Kern AS, Zee PC. Role of sleep timing in caloric intake and BMI. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(7):1374-81. Epub 2011/04/30.

96. Berg C, Lappas G, Wolk A, Strandhagen E, Toren K, Rosengren A, et al. Eating patterns and portion size associated with obesity in a Swedish population. *Appetite*. 2009;52(1):21-6. Epub 2008/08/13.

97. Summerbell CD, Moody RC, Shanks J, Stock MJ, Geissler C. Relationship between feeding pattern and body mass index in 220 free-living people in four age groups. *European journal of clinical nutrition*. 1996;50(8):513-9. Epub 1996/08/01.

98. de Castro JM. The time of day of food intake influences overall intake in humans. *The Journal of nutrition*. 2004;134(1):104-11. Epub 2004/01/06.

99. Boland WA, Connell PM, Vallen B. Time of day effects on the regulation of food consumption after activation of health goals. *Appetite*. 2013;70:47-52. Epub 2013/07/03.

100. Stanton JL, Jr., Keast DR. Serum cholesterol, fat intake, and breakfast consumption in the United States adult population. *Journal of the American College of Nutrition*. 1989;8(6):567-72. Epub 1989/12/01.

101. Garaulet M, Gomez-Abellan P, Alburquerque-Bejar JJ, Lee YC, Ordovas JM, Scheer FA. Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(4):604-11. Epub 2013/01/30.

102. Bandin C, Scheer FA, Luque AJ, Avila-Gandia V, Zamora S, Madrid JA, et al. Meal timing affects glucose tolerance, substrate oxidation and circadian-related variables: A randomized, crossover trial. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(5):828-33. Epub 2014/10/15.

103. Jakubowicz D, Barnea M, Wainstein J, Froy O. High caloric intake at breakfast vs. dinner differentially influences weight loss of overweight and obese women. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(12):2504-12. Epub 2013/03/21.

104. Garaulet M, Gomez-Abellan P. Timing of food intake and obesity: a novel association. *Physiology & behavior*. 2014;134:44-50. Epub 2014/01/29.

105. JJ DOD. Observation botanique. *Histoire de L'Académie Royale des Sciences*. 1729:35.

106. Pittendrigh CS. Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;58(4):1762-7. Epub 1967/10/01.

107. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *The Journal of endocrinology*. 2007;195(2):187-98. Epub 2007/10/24.

108. Garaulet M G-APMJ. Capítulo: Cronobiología y Nutrición. *Avances en Alimentación, Nutrición y Dietética 2013*. 2013( CL Volumen: on line Páginas, inicial: final: Fecha: 2013).

109. Kohsaka A, Bass J. A sense of time: how molecular clocks organize metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2007;18(1):4-11. Epub 2006/12/05.
110. Hastings M. ONJS, Maywood E. S. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *Journal of endocrinological investigation*. 2007;195:187-98.
111. Gomez-Santos C, Gomez-Abellan P, Madrid JA, Hernandez-Morante JJ, Lujan JA, Ordovas JM, et al. Circadian rhythm of clock genes in human adipose explants. *Obesity (Silver Spring)*. 2009;17(8):1481-5. Epub 2009/05/30.
112. Garaulet M, Ordovas JM, Gomez-Abellan P, Martinez JA, Madrid JA. An approximation to the temporal order in endogenous circadian rhythms of genes implicated in human adipose tissue metabolism. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(8):2075-80. Epub 2011/04/27.
113. Loboda A, Kraft WK, Fine B, Joseph J, Nebozhyn M, Zhang C, et al. Diurnal variation of the human adipose transcriptome and the link to metabolic disease. *BMC Med Genomics*. 2009;2:7. Epub 2009/02/11.
114. Ptitsyn AA, Zvonic S, Conrad SA, Scott LK, Mynatt RL, Gimble JM. Circadian clocks are resounding in peripheral tissues. *PLoS Comput Biol*. 2006;2(3):e16. Epub 2006/03/15.
115. M G, P G-A. Avances en alimentación, nutrición y dietética. *Cronobiología y Obesidad*2013.
116. Albrecht U, Eichele G. The mammalian circadian clock. *Current opinion in genetics & development*. 2003;13(3):271-7. Epub 2003/06/06.
117. Roenneberg T, Kuehnele T, Juda M, Kantermann T, Allebrandt K, Gordijn M, et al. Epidemiology of the human circadian clock. *Sleep medicine reviews*. 2007;11(6):429-38. Epub 2007/10/16.
118. Lara T, Madrid JA, Correa A. The vigilance decrement in executive function is attenuated when individual chronotypes perform at their optimal time of day. *PloS one*. 2014;9(2):e88820. Epub 2014/03/04.
119. Terman JS, Terman M, Lo ES, Cooper TB. Circadian time of morning light administration and therapeutic response in winter depression. *Archives of general psychiatry*. 2001;58(1):69-75. Epub 2001/02/07.
120. Levandovski R, Sasso E, Hidalgo MP. Chronotype: a review of the advances, limits and applicability of the main instruments used in the literature to assess human phenotype. *Trends in psychiatry and psychotherapy*. 2013;35(1):3-11. Epub 2013/01/01.
121. Phillips AJK, Clerx WM, O'Brien CS, Sano A, Barger LK, Picard RW, et al. Irregular sleep/wake patterns are associated with poorer academic performance and delayed circadian and sleep/wake timing. *Scientific reports*. 2017;7(1):3216. Epub 2017/06/14.
122. Pandi-Perumal SR, Smits M, Spence W, Srinivasan V, Cardinali DP, Lowe AD, et al. Dim light melatonin onset (DLMO): a tool for the analysis of circadian phase in human sleep and chronobiological disorders. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 2007;31(1):1-11. Epub 2006/08/04.
123. Nunes DM, Goncalves BSB, Tardelli Peixoto CA, De Bruin VMS, Louzada FM, De Bruin PFC. Circadian rest-activity rhythm in chronic obstructive pulmonary disease. *Chronobiology international*. 2017;34(9):1315-9. Epub 2017/10/21.
124. Van Someren EJ, Swaab DF, Colenda CC, Cohen W, McCall WV, Rosenquist PB. Bright light therapy: improved sensitivity to its effects on rest-activity rhythms in Alzheimer patients by application of nonparametric methods. *Chronobiology international*. 1999;16(4):505-18. Epub 1999/08/12.
125. Calogiuri G, Weydahl A, Carandente F. Methodological issues for studying the rest-activity cycle and sleep disturbances: a chronobiological approach using actigraphy data. *Biological research for nursing*. 2013;15(1):5-12. Epub 2011/08/09.

126. Bongers C, Hopman MTE, Eijsvogels TMH. Validity and reliability of the myTemp ingestible temperature capsule. *Journal of science and medicine in sport*. 2018;21(3):322-6. Epub 2017/06/25.
127. Edwards B, Waterhouse J, Reilly T, Atkinson G. A comparison of the suitabilities of rectal, gut, and insulated axilla temperatures for measurement of the circadian rhythm of core temperature in field studies. *Chronobiology international*. 2002;19(3):579-97. Epub 2002/06/19.
128. Martinez-Nicolas A, Ortiz-Tudela E, Rol MA, Madrid JA. Uncovering different masking factors on wrist skin temperature rhythm in free-living subjects. *PLoS one*. 2013;8(4):e61142. Epub 2013/04/12.
129. Rodriguez-Morilla B, Estivill E, Estivill-Domenech C, Albares J, Segarra F, Correa A, et al. Application of Machine Learning Methods to Ambulatory Circadian Monitoring (ACM) for Discriminating Sleep and Circadian Disorders. *Frontiers in neuroscience*. 2019;13:1318. Epub 2020/01/11.
130. Abe N, Kodama H. Distal-proximal skin temperature gradient prior to sleep onset in infants for clinical use. *Pediatrics international : official journal of the Japan Pediatric Society*. 2015;57(2):227-33. Epub 2014/08/22.
131. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Campos M, Rol MA, Madrid JA. A new integrated variable based on thermometry, actimetry and body position (TAP) to evaluate circadian system status in humans. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(11):e1000996. Epub 2010/11/19.
132. Ancoli-Israel S, Cole R, Alessi C, Chambers M, Moorcroft W, Pollak CP. The role of actigraphy in the study of sleep and circadian rhythms. *Sleep*. 2003;26(3):342-92. Epub 2003/05/17.
133. Madrid-Navarro CJ, Escamilla-Sevilla F, Minguez-Castellanos A, Campos M, Ruiz-Abellan F, Madrid JA, et al. Multidimensional Circadian Monitoring by Wearable Biosensors in Parkinson's Disease. *Frontiers in neurology*. 2018;9:157. Epub 2018/04/11.
134. Krauchi K, Cajochen C, Werth E, Wirz-Justice A. Functional link between distal vasodilation and sleep-onset latency? *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2000;278(3):R741-8. Epub 2000/03/11.
135. Madrid-Navarro CJ, Puertas Cuesta FJ, Escamilla-Sevilla F, Campos M, Ruiz Abellan F, Rol MA, et al. Validation of a Device for the Ambulatory Monitoring of Sleep Patterns: A Pilot Study on Parkinson's Disease. *Frontiers in neurology*. 2019;10:356. Epub 2019/04/30.
136. Bagenyi J. [Prevention and treatment of postoperative lung complications]. *Fogorvosi szemle*. 1976;69(11):321-4. Epub 1976/11/01. A posztoperatív tudoszovodmények megelőzése és kezelése.
137. Touitou Y, Reinberg A, Touitou D. Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: Health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life sciences*. 2017;173:94-106. Epub 2017/02/20.
138. Shilo L, Sabbah H, Hadari R, Kovatz S, Weinberg U, Dolev S, et al. The effects of coffee consumption on sleep and melatonin secretion. *Sleep medicine*. 2002;3(3):271-3. Epub 2003/11/01.
139. Dijk DJ, Cajochen C. Melatonin and the circadian regulation of sleep initiation, consolidation, structure, and the sleep EEG. *J Biol Rhythms*. 1997;12(6):627-35. Epub 1997/12/24.
140. Razavi P, Devore EE, Bajaj A, Lockley SW, Figueiro MG, Ricchiuti V, et al. Shift Work, Chronotype, and Melatonin Rhythm in Nurses. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2019;28(7):1177-86. Epub 2019/05/31.
141. Erren TC, Reiter RJ. Defining chronodisruption. *Journal of pineal research*. 2009;46(3):245-7. Epub 2009/02/14.

142. Wehrens SMT, Christou S, Isherwood C, Middleton B, Gibbs MA, Archer SN, et al. Meal Timing Regulates the Human Circadian System. *Current biology : CB*. 2017;27(12):1768-75 e3. Epub 2017/06/06.
143. Angeles-Castellanos M, Salgado-Delgado R, Rodriguez K, Buijs RM, Escobar C. Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience*. 2008;155(1):297-307. Epub 2008/07/01.
144. Blancas A, Gonzalez-Garcia SD, Rodriguez K, Escobar C. Progressive anticipation in behavior and brain activation of rats exposed to scheduled daily palatable food. *Neuroscience*. 2014;281:44-53. Epub 2014/09/27.
145. Guerrero-Vargas NN, Espitia-Bautista E, Buijs RM, Escobar C. Shift-work: is time of eating determining metabolic health? Evidence from animal models. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2018;77(3):199-215. Epub 2018/01/09.
146. Shostak A, Husse J, Oster H. Circadian regulation of adipose function. *Adipocyte*. 2013;2(4):201-6. Epub 2013/09/21.
147. Greendale MD NPL, Edgar R Arriola. The menopause. *The Lancet*. 1999;353(9152):571-80.
148. Organization WH. Research on the menopause in the 1990s. . WHO Tech Rep Ser 1990;866.
149. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Menopause-related changes in body fat distribution. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;904:502-6. Epub 2000/06/24.
150. Riobó P FdBB, Kozarcewski M,. Fernández Moya JM Obesidad en la mujer. *Nutr Hospitalaria*. 2003:233-7.
151. Toth MJ, Tchernof A, Sites CK, Poehlman ET. Effect of menopausal status on body composition and abdominal fat distribution. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2000;24(2):226-31. Epub 2000/03/07.
152. Arnlov J, Pencina MJ, Amin S, Nam BH, Benjamin EJ, Murabito JM, et al. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease incidence in men. *Annals of internal medicine*. 2006;145(3):176-84. Epub 2006/08/02.
153. Luczak ED, Leinwand LA. Sex-based cardiac physiology. *Annual review of physiology*. 2009;71:1-18. Epub 2008/10/03.
154. Teede HJ, Lombard C, Deeks AA. Obesity, metabolic complications and the menopause: an opportunity for prevention. *Climacteric : the journal of the International Menopause Society*. 2010;13(3):203-9. Epub 2009/10/30.
155. Hale GE, Burger HG. Hormonal changes and biomarkers in late reproductive age, menopausal transition and menopause. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2009;23(1):7-23. Epub 2008/12/03.
156. Kennedy RL, Chokkalingham K, Srinivasan R. Obesity in the elderly: who should we be treating, and why, and how? *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2004;7(1):3-9. Epub 2004/04/20.
157. Pasquali R, Casimirri F, Labate AM, Tortelli O, Pascal G, Anconetani B, et al. Body weight, fat distribution and the menopausal status in women. The VMH Collaborative Group. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1994;18(9):614-21. Epub 1994/09/01.
158. Hwu CM, Fuh JL, Hsiao CF, Wang SJ, Lu SR, Wei MC, et al. Waist circumference predicts metabolic cardiovascular risk in postmenopausal Chinese women. *Menopause*. 2003;10(1):73-80. Epub 2003/01/25.
159. Benloucif S, Masana MI, Dubocovich ML. Responsiveness to melatonin and its receptor expression in the aging circadian clock of mice. *The American journal of physiology*. 1997;273(6):R1855-60. Epub 1998/01/22.

160. Davidson AJ, Castanon-Cervantes O, Leise TL, Molyneux PC, Harrington ME. Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. *The European journal of neuroscience*. 2009;29(1):171-80. Epub 2008/11/27.
161. Gibson EM, Williams WP, 3rd, Kriegsfeld LJ. Aging in the circadian system: considerations for health, disease prevention and longevity. *Experimental gerontology*. 2009;44(1-2):51-6. Epub 2008/06/27.
162. Hernandez-Morante JJ, Gomez-Santos C, Margareto J, Formiguera X, Martinez CM, Gonzalez R, et al. Influence of menopause on adipose tissue clock gene genotype and its relationship with metabolic syndrome in morbidly obese women. *Age (Dordr)*. 2012;34(6):1369-80. Epub 2011/09/08.
163. Rangel-Zuniga OA, Cruz-Teno C, Haro C, Quintana-Navarro GM, Camara-Martos F, Perez-Martinez P, et al. Differential menopause- versus aging-induced changes in oxidative stress and circadian rhythm gene markers. *Mechanisms of ageing and development*. 2017;164:41-8. Epub 2017/04/15.
164. Garaulet M G-APMJ. Chronobiology and obesity: the orchestra out of tune. *Clinical Lipidology*. 2017:181-8.
165. Garaulet M, Hernandez-Morante JJ, Lujan J, Tebar FJ, Zamora S. Relationship between fat cell size and number and fatty acid composition in adipose tissue from different fat depots in overweight/obese humans. *Int J Obes (Lond)*. 2006;30(6):899-905. Epub 2006/02/01.
166. Garcia-Prieto MD, Tebar FJ, Nicolas F, Larque E, Zamora S, Garaulet M. Cortisol secretory pattern and glucocorticoid feedback sensitivity in women from a Mediterranean area: relationship with anthropometric characteristics, dietary intake and plasma fatty acid profile. *Clinical endocrinology*. 2007;66(2):185-91. Epub 2007/01/17.
167. Gomez-Santos C, Saura CB, Lucas JA, Castell P, Madrid JA, Garaulet M. Menopause status is associated with circadian- and sleep-related alterations. *Menopause*. 2016;23(6):682-90. Epub 2016/04/20.
168. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81. Epub 2008/02/29.
169. Tilg H, Kaser A. Gut microbiome, obesity, and metabolic dysfunction. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(6):2126-32. Epub 2011/06/03.
170. Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88(4):894-9. Epub 2008/10/10.
171. Damms-Machado A, Mitra S, Schollenberger AE, Kramer KM, Meile T, Konigsrainer A, et al. Effects of surgical and dietary weight loss therapy for obesity on gut microbiota composition and nutrient absorption. *BioMed research international*. 2015;2015:806248. Epub 2015/02/25.
172. Goodson JM, Groppo D, Halem S, Carpino E. Is obesity an oral bacterial disease? *Journal of dental research*. 2009;88(6):519-23. Epub 2009/07/10.
173. Takeshita T, Kageyama S, Furuta M, Tsuboi H, Takeuchi K, Shibata Y, et al. Bacterial diversity in saliva and oral health-related conditions: the Hisayama Study. *Scientific reports*. 2016;6:22164. Epub 2016/02/26.
174. Anhe FF, Roy D, Pilon G, Dudonne S, Matamoros S, Varin TV, et al. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*. 2015;64(6):872-83. Epub 2014/08/01.
175. Cani PD, Everard A. [*Akkermansia muciniphila*: a novel target controlling obesity, type 2 diabetes and inflammation?]. *Medecine sciences : M/S*. 2014;30(2):125-7. Epub



2014/02/28. Akkermansia muciniphila - Une nouvelle cible pour contrôler l'obésité, le diabète de type 2 et l'inflammation ?

176. Strat KM, Rowley T, Smithson AT, Tessem JS, Hulver MW, Liu D, et al. Mechanisms by which cocoa flavanols improve metabolic syndrome and related disorders. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2016;35:1-21. Epub 2016/08/26.

177. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*. 1995;125(6):1401-12. Epub 1995/06/01.

178. Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GG, George T, Leonczak J, Gibson GR, et al. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora. *The British journal of nutrition*. 2008;99(4):782-92. Epub 2007/11/06.

179. Zarrinpar A, Chaix A, Yooseph S, Panda S. Diet and feeding pattern affect the diurnal dynamics of the gut microbiome. *Cell metabolism*. 2014;20(6):1006-17. Epub 2014/12/04.

180. Kaczmarek JL, Musaad SM, Holscher HD. Time of day and eating behaviors are associated with the composition and function of the human gastrointestinal microbiota. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;106(5):1220-31. Epub 2017/10/04.

181. Collado MC, Engen PA, Bandin C, Cabrera-Rubio R, Voigt RM, Green SJ, et al. Timing of food intake impacts daily rhythms of human salivary microbiota: a randomized, crossover study. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2018;32(4):2060-72. Epub 2017/12/14.

182. S.L. BTM. Analizador de Composición Corporal TANITA®. Información Técnica. 1998.

183. Nunez C, Gallagher D, Visser M, Pi-Sunyer FX, Wang Z, Heymsfield SB. Bioimpedance analysis: evaluation of leg-to-leg system based on pressure contact footpad electrodes. *Medicine and science in sports and exercise*. 1997;29(4):524-31. Epub 1997/04/01.

184. Varela Moreiras G, Cuadrado Vives C, del Pozo de la Calle S, Ruiz Moreno E, Moreiras Tuny O. Valoración de la dieta española de acuerdo al panel de consumo alimentario. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Madrid. 2008.

185. Dashti HS, Gomez-Abellan P, Qian J, Esteban A, Morales E, Scheer F, et al. Late eating is associated with cardiometabolic risk traits, obesogenic behaviors, and impaired weight loss. *The American journal of clinical nutrition*. 2020. Epub 2020/10/07.

186. Ortiz-Tudela E, Martinez-Nicolas A, Albares J, Segarra F, Campos M, Estivill E, et al. Ambulatory circadian monitoring (ACM) based on thermometry, motor activity and body position (TAP): a comparison with polysomnography. *Physiology & behavior*. 2014;126:30-8. Epub 2014/01/09.

187. Hofstra WA, de Weerd AW. How to assess circadian rhythm in humans: a review of literature. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2008;13(3):438-44. Epub 2008/07/01.

188. Zeitzer JM, Duffy JF, Lockley SW, Dijk DJ, Czeisler CA. Plasma melatonin rhythms in young and older humans during sleep, sleep deprivation, and wake. *Sleep*. 2007;30(11):1437-43. Epub 2007/11/29.

189. Garcia-Mantrana I, Selma-Royo M, Alcantara C, Collado MC. Shifts on Gut Microbiota Associated to Mediterranean Diet Adherence and Specific Dietary Intakes on General Adult Population. *Front Microbiol*. 2018;9:890. Epub 2018/06/06.

190. Anson NM, Havenaar R, Vaes W, Coulier L, Venema K, Selinheimo E, et al. Effect of bioprocessing of wheat bran in wholemeal wheat breads on the colonic SCFA production in vitro and postprandial plasma concentrations in men. *Food Chem*. 2011;128(2):404-9. Epub 2011/09/15.

191. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008;371(9612):569-78. Epub 2008/02/19.

192. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature*. 2006;444(7121):875-80. Epub 2006/12/15.

193. Carman WJ, Sowers M, Hawthorne VM, Weissfeld LA. Obesity as a risk factor for osteoarthritis of the hand and wrist: a prospective study. *Am J Epidemiol.* 1994;139(2):119-29. Epub 1994/01/15.
194. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 2006;444(7121):840-6. Epub 2006/12/15.
195. McCormick B, Stone I. Economic costs of obesity and the case for government intervention. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity.* 2007;8 Suppl 1:161-4. Epub 2007/02/24.
196. Golomb BA, Koperski S, White HL. Association between more frequent chocolate consumption and lower body mass index. *Archives of internal medicine.* 2012;172(6):519-21. Epub 2012/03/28.
197. O'Neil CE, Fulgoni VL, 3rd, Nicklas TA. Candy consumption was not associated with body weight measures, risk factors for cardiovascular disease, or metabolic syndrome in US adults: NHANES 1999-2004. *Nutrition research (New York, NY).* 2011;31(2):122-30. Epub 2011/03/23.
198. Piehowski KE, Preston AG, Miller DL, Nickols-Richardson SM. A reduced-calorie dietary pattern including a daily sweet snack promotes body weight reduction and body composition improvements in premenopausal women who are overweight and obese: a pilot study. *J Am Diet Assoc.* 2011;111(8):1198-203. Epub 2011/08/02.
199. Desch S, Kobler D, Schmidt J, Sonnabend M, Adams V, Sareban M, et al. Low vs. higher-dose dark chocolate and blood pressure in cardiovascular high-risk patients. *American journal of hypertension.* 2010;23(6):694-700. Epub 2010/03/06.
200. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schomig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2007;298(1):49-60. Epub 2007/07/05.
201. Ried K, Frank OR, Stocks NP. Dark chocolate or tomato extract for prehypertension: a randomised controlled trial. *BMC complementary and alternative medicine.* 2009;9:22. Epub 2009/07/09.
202. Flammer AJ, Sudano I, Wolfrum M, Thomas R, Enseleit F, Periat D, et al. Cardiovascular effects of flavanol-rich chocolate in patients with heart failure. *European heart journal.* 2012;33(17):2172-80. Epub 2011/12/17.
203. Njike VY, Faridi Z, Shuval K, Dutta S, Kay CD, West SG, et al. Effects of sugar-sweetened and sugar-free cocoa on endothelial function in overweight adults. *International journal of cardiology.* 2011;149(1):83-8. Epub 2009/12/29.
204. Davison K, Coates AM, Buckley JD, Howe PR. Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(8):1289-96. Epub 2008/05/28.
205. Bowser SM, Moore WT, McMillan RP, Dorenkott MR, Goodrich KM, Ye L, et al. High-molecular-weight cocoa procyanidins possess enhanced insulin-enhancing and insulin mimetic activities in human primary skeletal muscle cells compared to smaller procyanidins. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2017;39:48-58. Epub 2016/11/07.
206. Dorenkott MR, Griffin LE, Goodrich KM, Thompson-Witrick KA, Fundaro G, Ye L, et al. Oligomeric cocoa procyanidins possess enhanced bioactivity compared to monomeric and polymeric cocoa procyanidins for preventing the development of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance during high-fat feeding. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2014;62(10):2216-27. Epub 2014/02/25.
207. Karen D. Lazaro<sup>1</sup> VL, and Buena Sapang<sup>3</sup>. The Effect of Flavanol-Rich Cocoa on Insulin Sensitivity in Overweight and Obese Individuals: A Meta-Analysis. *Journal of the ASEAN Federation of Endocrine Societies.* 2012; 27, 196.
208. Latif R. Health benefits of cocoa. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care.* 2013;16(6):669-74. Epub 2013/10/09.

209. Matsui N, Ito R, Nishimura E, Yoshikawa M, Kato M, Kamei M, et al. Ingested cocoa can prevent high-fat diet-induced obesity by regulating the expression of genes for fatty acid metabolism. *Nutrition*. 2005;21(5):594-601. Epub 2005/04/27.
210. Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *The Journal of physiology*. 2006;574(Pt 1):41-53. Epub 2006/04/29.
211. Gu Y, Hurst WJ, Stuart DA, Lambert JD. Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2011;59(10):5305-11. Epub 2011/04/19.
212. Massolt ET, van Haard PM, Rehfeld JF, Posthuma EF, van der Veer E, Schweitzer DH. Appetite suppression through smelling of dark chocolate correlates with changes in ghrelin in young women. *Regulatory peptides*. 2010;161(1-3):81-6. Epub 2010/01/28.
213. Ali F, Ismail A, Esa NM, Pei C. Cocoa polyphenols treatment ameliorates visceral obesity by reduction lipogenesis and promoting fatty acid oxidation genes in obese rats through interfering with AMPK pathway. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2016;118(4):564-75.
214. Yamashita Y, Mitani T, Wang L, Ashida H. Methylxanthine Derivative-Rich Cacao Extract Suppresses Differentiation of Adipocytes through Downregulation of PPARgamma and C/EBPs. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2018;64(2):151-60. Epub 2018/05/02.
215. Keeler CL, Mattes RD, Tan SY. Anticipatory and reactive responses to chocolate restriction in frequent chocolate consumers. *Obesity (Silver Spring)*. 2015;23(6):1130-5. Epub 2015/05/27.
216. Harper A, James A, Flint A, Astrup A. Increased satiety after intake of a chocolate milk drink compared with a carbonated beverage, but no difference in subsequent ad libitum lunch intake. *The British journal of nutrition*. 2007;97(3):579-83. Epub 2007/02/23.
217. Marsh CE, Green DJ, Naylor LH, Guelfi KJ. Consumption of dark chocolate attenuates subsequent food intake compared with milk and white chocolate in postmenopausal women. *Appetite*. 2017;116:544-51. Epub 2017/06/03.
218. Sorensen LB, Astrup A. Eating dark and milk chocolate: a randomized crossover study of effects on appetite and energy intake. *Nutrition & diabetes*. 2011;1:e21. Epub 2011/01/01.
219. Akyol A, Dasgin H, Ayaz A, Buyuktuncer Z, Besler HT. beta-Glucan and dark chocolate: a randomized crossover study on short-term satiety and energy intake. *Nutrients*. 2014;6(9):3863-77. Epub 2014/09/25.
220. Greenberg JA, O'Donnell R, Shurpin M, Kordunova D. Epicatechin, procyanidins, cocoa, and appetite: a randomized controlled trial. *The American journal of clinical nutrition*. 2016;104(3):613-9. Epub 2016/08/12.
221. al DGe. Escala Visual Analógica (VAS). *Revista de Enfermería Clínica*. 2001;10:697-706.
222. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology*. 2001;26(1):37-49. Epub 2000/11/09.
223. Jimenez-Cruz A, Jimenez AB, Pichardo-Osuna A, Chaudry T, Bacardi-Gascon M. Long term effect of Mediterranean diet on weight loss. *Nutricion hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Espanola de Nutricion Parenteral y Enteral*. 2009;24(6):753-4. Epub 2010/01/06.
224. Stok FM, de Vet E, de Wit JB, Renner B, de Ridder DT. Communicating eating-related rules. Suggestions are more effective than restrictions. *Appetite*. 2015;86:45-53. Epub 2014/09/24.
225. Kuijter RG, Boyce JA, Marshall EM. Associating a prototypical forbidden food item with guilt or celebration: relationships with indicators of (un)healthy eating and the

- moderating role of stress and depressive symptoms. *Psychology & health*. 2015;30(2):203-17. Epub 2014/09/05.
226. Kuijter RG, Boyce JA. Chocolate cake. Guilt or celebration? Associations with healthy eating attitudes, perceived behavioural control, intentions and weight-loss. *Appetite*. 2014;74:48-54. Epub 2013/11/28.
227. Vallerand AL. Effects of ephedrine/xanthines on thermogenesis and cold tolerance. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 1993;17 Suppl 1:S53-6. Epub 1993/02/01.
228. Tarka SM, Jr., Arnaud MJ, Dvorchik BH, Vesell ES. Theobromine kinetics and metabolic disposition. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1983;34(4):546-55. Epub 1983/10/01.
229. Lelo A, Birkett DJ, Robson RA, Miners JO. Comparative pharmacokinetics of caffeine and its primary demethylated metabolites paraxanthine, theobromine and theophylline in man. *British journal of clinical pharmacology*. 1986;22(2):177-82. Epub 1986/08/01.
230. McHill AW, Wright KP, Jr. Role of sleep and circadian disruption on energy expenditure and in metabolic predisposition to human obesity and metabolic disease. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2017;18 Suppl 1:15-24. Epub 2017/02/07.
231. Wittmann M, Dinich J, Meroz M, Roenneberg T. Social jetlag: misalignment of biological and social time. *Chronobiology international*. 2006;23(1-2):497-509. Epub 2006/05/12.
232. Lunsford-Avery JR, Engelhard MM, Navar AM, Kollins SH. Validation of the Sleep Regularity Index in Older Adults and Associations with Cardiometabolic Risk. *Scientific reports*. 2018;8(1):14158. Epub 2018/09/23.
233. Kripke DF, Simons RN, Garfinkel L, Hammond EC. Short and long sleep and sleeping pills. Is increased mortality associated? *Archives of general psychiatry*. 1979;36(1):103-16. Epub 1979/01/01.
234. Wingard DL, Berkman LF. Mortality risk associated with sleeping patterns among adults. *Sleep*. 1983;6(2):102-7. Epub 1983/01/01.
235. Leproult R, Holmback U, Van Cauter E. Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss. *Diabetes*. 2014;63(6):1860-9. Epub 2014/01/25.
236. Morris CJ, Purvis TE, Hu K, Scheer FA. Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(10):E1402-11. Epub 2016/02/10.
237. Knutson KL, von Schantz M. Associations between chronotype, morbidity and mortality in the UK Biobank cohort. *Chronobiology international*. 2018;35(8):1045-53. Epub 2018/04/13.
238. Trichopoulos D, Tzonou A, Christopoulos C, Havatzoglou S, Trichopoulou A. Does a siesta protect from coronary heart disease? *Lancet*. 1987;2(8553):269-70. Epub 1987/08/01.
239. Chen M, Zhang X, Liang Y, Xue H, Gong Y, Xiong J, et al. Associations between nocturnal sleep duration, midday nap duration and body composition among adults in Southwest China. *PloS one*. 2019;14(10):e0223665. Epub 2019/10/17.
240. Dashti HS, Daghlas I, Lane JM, Huang Y, Udler MS, Wang H, et al. Genetic determinants of daytime napping and effects on cardiometabolic health. *Nature communications*. 2021;12(1):900. Epub 2021/02/12.
241. Dulloo AG, Miller DS. The thermogenic properties of ephedrine/methylxanthine mixtures: human studies. *Int J Obes*. 1986;10(6):467-81. Epub 1986/01/01.
242. Rumpler W, Seale J, Clevidence B, Judd J, Wiley E, Yamamoto S, et al. Oolong tea increases metabolic rate and fat oxidation in men. *The Journal of nutrition*. 2001;131(11):2848-52. Epub 2001/11/06.

243. Shaw CS, Clark J, Wagenmakers AJ. The effect of exercise and nutrition on intramuscular fat metabolism and insulin sensitivity. *Annual review of nutrition*. 2010;30:13-34. Epub 2010/04/09.
244. Yeo WK, Carey AL, Burke L, Spriet LL, Hawley JA. Fat adaptation in well-trained athletes: effects on cell metabolism. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2011;36(1):12-22. Epub 2011/02/18.
245. Fletcher G, Eves FF, Glover EI, Robinson SL, Vernooij CA, Thompson JL, et al. Dietary intake is independently associated with the maximal capacity for fat oxidation during exercise. *The American journal of clinical nutrition*. 2017;105(4):864-72. Epub 2017/03/03.
246. Miles-Chan JL, Dulloo AG, Schutz Y. Fasting substrate oxidation at rest assessed by indirect calorimetry: is prior dietary macronutrient level and composition a confounder? *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(7):1114-7. Epub 2015/03/17.
247. Stellingwerff T, Spriet LL, Watt MJ, Kimber NE, Hargreaves M, Hawley JA, et al. Decreased PDH activation and glycogenolysis during exercise following fat adaptation with carbohydrate restoration. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2006;290(2):E380-8. Epub 2005/09/29.
248. Vogt M, Puntschart A, Howald H, Mueller B, Mannhart C, Gfeller-Tuescher L, et al. Effects of dietary fat on muscle substrates, metabolism, and performance in athletes. *Medicine and science in sports and exercise*. 2003;35(6):952-60. Epub 2003/06/05.
249. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nature medicine*. 2019;25(7):1096-103. Epub 2019/07/03.
250. Maughan RJ, Leiper JB. Sodium intake and post-exercise rehydration in man. *European journal of applied physiology and occupational physiology*. 1995;71(4):311-9. Epub 1995/01/01.
251. Marshall HM, Allison KC, O'Reardon JP, Birketvedt G, Stunkard AJ. Night eating syndrome among nonobese persons. *The International journal of eating disorders*. 2004;35(2):217-22. Epub 2004/03/03.
252. Groen BB, Res PT, Pennings B, Hertle E, Senden JM, Saris WH, et al. Intra-gastric protein administration stimulates overnight muscle protein synthesis in elderly men. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2012;302(1):E52-60. Epub 2011/09/16.
253. Res PT, Groen B, Pennings B, Beelen M, Wallis GA, Gijsen AP, et al. Protein ingestion before sleep improves postexercise overnight recovery. *Medicine and science in sports and exercise*. 2012;44(8):1560-9. Epub 2012/02/15.
254. Madzima TA, Panton LB, Fretti SK, Kinsey AW, Ormsbee MJ. Night-time consumption of protein or carbohydrate results in increased morning resting energy expenditure in active college-aged men. *The British journal of nutrition*. 2014;111(1):71-7. Epub 2013/06/19.
255. Kinsey AW, Eddy WR, Madzima TA, Panton LB, Arciero PJ, Kim JS, et al. Influence of night-time protein and carbohydrate intake on appetite and cardiometabolic risk in sedentary overweight and obese women. *The British journal of nutrition*. 2014;112(3):320-7. Epub 2014/05/17.
256. Ormsbee MJ, Gorman KA, Miller EA, Baur DA, Eckel LA, Contreras RJ, et al. Nighttime feeding likely alters morning metabolism but not exercise performance in female athletes. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*. 2016;41(7):719-27. Epub 2016/06/23.
257. van Loon LJ, Greenhaff PL, Constantin-Teodosiu D, Saris WH, Wagenmakers AJ. The effects of increasing exercise intensity on muscle fuel utilisation in humans. *The Journal of physiology*. 2001;536(Pt 1):295-304. Epub 2001/10/02.
258. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2003;51(25):7292-5. Epub 2003/12/03.

259. Van Cauter E, Blackman JD, Roland D, Spire JP, Refetoff S, Polonsky KS. Modulation of glucose regulation and insulin secretion by circadian rhythmicity and sleep. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(3):934-42. Epub 1991/09/01.
260. Ramos S, Martin MA, Goya L. Effects of Cocoa Antioxidants in Type 2 Diabetes Mellitus. *Antioxidants (Basel)*. 2017;6(4). Epub 2017/11/01.
261. Hayek N. Chocolate, gut microbiota, and human health. *Front Pharmacol*. 2013;4:11. Epub 2013/02/14.
262. Magrone T, Russo MA, Jirillo E. Cocoa and Dark Chocolate Polyphenols: From Biology to Clinical Applications. *Front Immunol*. 2017;8:677. Epub 2017/06/27.
263. Radojčić Redovniković I, Delonga, K., Mazor, S., Dragović-Uzelac, V., Carić, M. y Vorkapić-Furač, J. Polyphenolic Content and Composition and Antioxidative Activity of Different Cocoa Liquors. *Czech Journal Food Science*. 2009;27 (nº5):330-7.
264. Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *The American journal of clinical nutrition*. 2011;93(1):62-72. Epub 2010/11/12.
265. Amelink GJ, Koot RW, Erich WB, Van Gijn J, Bar PR. Sex-linked variation in creatine kinase release, and its dependence on oestradiol, can be demonstrated in an in-vitro rat skeletal muscle preparation. *Acta Physiol Scand*. 1990;138(2):115-24. Epub 1990/02/01.
266. Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*. 2017;15(1):73. Epub 2017/04/09.
267. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011;473(7346):174-80. Epub 2011/04/22.
268. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 2007;14(4):169-81. Epub 2007/10/06.
269. Bäckhed F LR, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915-20.
270. Topping DL, Clifton PM. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews*. 2001;81(3):1031-64. Epub 2001/06/28.
271. Canfora EE, Blaak EE. The role of polydextrose in body weight control and glucose regulation. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*. 2015;18(4):395-400. Epub 2015/06/08.
272. Oliveira DN, A. Effect of dark-chocolate on appetite variables and glucose tolerance: A 4 week randomized crossover intervention in healthy middle aged subjects. *Journal of Functional Foods*. 2017;37:390-9.
273. Frost G, Sleeth ML, Sahuri-Arisoylu M, Lizarbe B, Cerdan S, Brody L, et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications*. 2014;5:3611. Epub 2014/05/02.
274. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC public health*. 2009;9:88. Epub 2009/03/27.

# ANEXOS

---





## TEST DE ESCALA ANALÓGICA VISUAL (VAS)

**Marca con una X en la línea de respuesta (o bien, califica de 0 al 10), al nivel que corresponda, desde nada hasta extremadamente según la situación que nos propongan.**

Se rellenará a diferentes horas, tal y como sigue:

1º) Justo en el momento de levantarse por la mañana.

2º) Justo antes de desayunar, con la comida en la mesa.

3º) Recién terminado de desayunar.

4º) Antes de comer, con la comida en la mesa.

5º) Recién terminado de comer.

6º) Antes de cenar, con la comida en la mesa.

7º) Recién terminado de cenar.

8º) En la cama, antes de dormir.

**1) Justo en el momento de levantarse por la mañana**

Fecha \_\_\_\_\_

Hora \_\_\_\_\_

**APETITO**

Por favor responde a estas preguntas considerando solo cómo te sientes en este preciso momento teniendo en cuenta tu apetito justo en este momento, y sin preocuparte por las calorías, la grasa o si es una dieta saludable o no.

Dime cuanto disfrutarías comiendo alimentos de cada una de las siguientes 7 categorías:

**DULCES:** (como pasteles, caramelos, galletas, helados o bollería)

\_\_\_\_\_

**Nada**

**Mucho**

**COMIDAS SALADAS:** (como patatas fritas de bolsa, saladitos, frutos secos)

\_\_\_\_\_

**Nada**

**Mucho**

**ALIMENTOS RICOS EN CARBOHIDRATOS:** (como pan, pasta, arroz, patatas)

---

**Nada** **Mucho**

**FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTA**

---

**Nada** **Mucho**

**VERDURAS**

---

**Nada** **Mucho**

**CARNE, DERIVADOS DEL POLLO, PESCADO O HUEVOS**

---

**Nada** **Mucho**

**PRODUCTOS LÁCTEOS:** como leche, queso o yogurt

---

**Nada** **Mucho**

## HAMBRE

¿Cómo de hambriento te sientes justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de sediento te sientes justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de lleno sientes tu estómago justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de fuerte es tu deseo de comer justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cuánto piensas que podrías comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno (nauseas) te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

**2) Justo antes de desayunar, con la comida en la mesa**

Fecha \_\_\_\_\_

Hora \_\_\_\_\_

**APETITO**

Por favor responde a estas preguntas considerando solo cómo te sientes en este preciso momento teniendo en cuenta tu apetito justo en este momento, y sin preocuparte por las calorías, la grasa o si es una dieta saludable o no.

Dime cuanto disfrutarías comiendo alimentos de cada una de las siguientes 7 categorías:

**DULCES:** (como pasteles, caramelos, galletas, helados o bollería)

---

**Nada** **Mucho**

**COMIDAS SALADAS:** (como patatas fritas de bolsa, saladitos, frutos secos)

---

**Nada** **Mucho**

**ALIMENTOS RICOS EN CARBOHIDRATOS:** (como pan, pasta, arroz, patatas)

---

**Nada** **Mucho**

**FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTA**

---

**Nada** **Mucho**

**VERDURAS**

---

**Nada** **Mucho**

**CARNE, DERIVADOS DEL POLLO, PESCADO O HUEVOS**

---

**Nada** **Mucho**

**PRODUCTOS LÁCTEOS: como leche, queso o yogurt**

---

**Nada** **Mucho**

**HAMBRE**

**¿Cómo de hambriento te sientes justo ahora?**

---

**Nada** **Extremadamente**

**¿Cómo de sediento te sientes justo ahora?**

---

**Nada** **Extremadamente**

¿Cómo de lleno sientes tu estómago justo ahora?

\_\_\_\_\_

Nada

Extremadamente

¿Cómo de fuerte es tu deseo de comer justo ahora?

\_\_\_\_\_

Nada

Extremadamente

¿Cuánto piensas que podrías comer justo ahora?

\_\_\_\_\_

Nada

Extremadamente

¿Cómo de lleno (nauseas) te sientes justo ahora?

\_\_\_\_\_

Nada

Extremadamente

**3) Recién terminado de desayunar**

Fecha \_\_\_\_\_

Hora \_\_\_\_\_

**APETITO**



Por favor responde a estas preguntas considerando solo cómo te sientes en este preciso momento teniendo en cuenta tu apetito justo en este momento, y sin preocuparte por las calorías, la grasa o si es una dieta saludable o no.

Dime cuanto disfrutarías comiendo alimentos de cada una de las siguientes 7 categorías:

**DULCES:** (como pasteles, caramelos, galletas, helados o bollería)

\_\_\_\_\_

**Nada** **Mucho**

**COMIDAS SALADAS:** (como patatas fritas de bolsa, saladitos, frutos secos)

\_\_\_\_\_

**Nada** **Mucho**

**ALIMENTOS RICOS EN CARBOHIDRATOS:** (como pan, pasta, arroz, patatas)

\_\_\_\_\_

**Nada** **Mucho**

**FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTA**

---

Nada Mucho

**VERDURAS**

---

Nada Mucho

**CARNE, DERIVADOS DEL POLLO, PESCADO O HUEVOS**

---

Nada Mucho

**PRODUCTOS LÁCTEOS: como leche, queso o yogurt**

---

Nada Mucho

**HAMBRE**

¿Cómo de hambriento te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de sediento te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno sientes tu estómago justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de fuerte es tu deseo de comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cuánto piensas que podrías comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno (nauseas) te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

**4) Antes de comer, con la comida en la mesa**

Fecha \_\_\_\_\_

Hora \_\_\_\_\_

**APETITO**

Por favor responde a estas preguntas considerando solo cómo te sientes en este preciso momento teniendo en cuenta tu apetito justo en este momento, y sin preocuparte por las calorías, la grasa o si es una dieta saludable o no.

Dime cuanto disfrutarías comiendo alimentos de cada una de las siguientes 7 categorías:

**DULCES:** (como pasteles, caramelos, galletas, helados o bollería)

\_\_\_\_\_

**Nada** **Mucho**

**COMIDAS SALADAS:** (como patatas fritas de bolsa, saladitos, frutos secos)

\_\_\_\_\_

**Nada** **Mucho**

**ALIMENTOS RICOS EN CARBOHIDRATOS:** (como pan, pasta, arroz, patatas)

---

**Nada** **Mucho**

**FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTA**

---

**Nada** **Mucho**

**VERDURAS**

---

**Nada** **Mucho**

**CARNE, DERIVADOS DEL POLLO, PESCADO O HUEVOS**

---

**Nada** **Mucho**

**PRODUCTOS LÁCTEOS:** como leche, queso o yogurt

---

**Nada** **Mucho**

## HAMBRE

¿Cómo de hambriento te sientes justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de sediento te sientes justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de lleno sientes tu estómago justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de fuerte es tu deseo de comer justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cuánto piensas que podrías comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno (nauseas) te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

**5) Recién terminado de comer**

Fecha \_\_\_\_\_

Hora \_\_\_\_\_

**APETITO**

Por favor responde a estas preguntas considerando solo cómo te sientes en este preciso momento teniendo en cuenta tu apetito justo en este momento, y sin preocuparte por las calorías, la grasa o si es una dieta saludable o no.

Dime cuanto disfrutarías comiendo alimentos de cada una de las siguientes 7 categorías:

**DULCES:** (como pasteles, caramelos, galletas, helados o bollería)

---

**Nada** **Mucho**

**COMIDAS SALADAS:** (como patatas fritas de bolsa, saladitos, frutos secos)

---

**Nada** **Mucho**

**ALIMENTOS RICOS EN CARBOHIDRATOS:** (como pan, pasta, arroz, patatas)

---

**Nada** **Mucho**

**FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTA**

---

**Nada** **Mucho**

**VERDURAS**

---

**Nada** **Mucho**



**CARNE, DERIVADOS DEL POLLO, PESCADO O HUEVOS**

---

**Nada** **Mucho**

**PRODUCTOS LÁCTEOS: como leche, queso o yogurt**

---

**Nada** **Mucho**

**HAMBRE**

**¿Cómo de hambriento te sientes justo ahora?**

---

**Nada** **Extremadamente**

**¿Cómo de sediento te sientes justo ahora?**

---

**Nada** **Extremadamente**

¿Cómo de lleno sientes tu estómago justo ahora?

\_\_\_\_\_

Nada Extremadamente

¿Cómo de fuerte es tu deseo de comer justo ahora?

\_\_\_\_\_

Nada Extremadamente

¿Cuánto piensas que podrías comer justo ahora?

\_\_\_\_\_

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno (nauseas) te sientes justo ahora?

\_\_\_\_\_

Nada Extremadamente

**6) Antes de cenar, con la comida en la mesa**

Fecha \_\_\_\_\_

Hora \_\_\_\_\_

## APETITO

Por favor responde a estas preguntas considerando solo cómo te sientes en este preciso momento teniendo en cuenta tu apetito justo en este momento, y sin preocuparte por las calorías, la grasa o si es una dieta saludable o no.

Dime cuanto disfrutarías comiendo alimentos de cada una de las siguientes 7 categorías:

**DULCES:** (como pasteles, caramelos, galletas, helados o bollería)

---

**Nada**

**Mucho**

**COMIDAS SALADAS:** (como patatas fritas de bolsa, saladitos, frutos secos)

---

**Nada**

**Mucho**

**ALIMENTOS RICOS EN CARBOHIDRATOS:** (como pan, pasta, arroz, patatas)

---

**Nada**

**Mucho**

**FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTA**

---

**Nada** **Mucho**

**VERDURAS**

---

**Nada** **Mucho**

**CARNE, DERIVADOS DEL POLLO, PESCADO O HUEVOS**

---

**Nada** **Mucho**

**PRODUCTOS LÁCTEOS: como leche, queso o yogurt**

---

**Nada** **Mucho**

## HAMBRE

¿Cómo de hambriento te sientes justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de sediento te sientes justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de lleno sientes tu estómago justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cómo de fuerte es tu deseo de comer justo ahora?

---

Nada

Extremadamente

¿Cuánto piensas que podrías comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno (nauseas) te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

**DIA 1: 7) Recién terminado de cenar**

Fecha \_\_\_\_\_

Hora \_\_\_\_\_

**APETITO**

Por favor responde a estas preguntas considerando solo cómo te sientes en este preciso momento teniendo en cuenta tu apetito justo en este momento, y sin preocuparte por las calorías, la grasa o si es una dieta saludable o no.

Dime cuanto disfrutarías comiendo alimentos de cada una de las siguientes 7 categorías:

**DULCES:** (como pasteles, caramelos, galletas, helados o bollería)

---

**Nada** **Mucho**

**COMIDAS SALADAS:** (como patatas fritas de bolsa, saladitos, frutos secos)

---

**Nada** **Mucho**

**ALIMENTOS RICOS EN CARBOHIDRATOS:** (como pan, pasta, arroz, patatas)

---

**Nada** **Mucho**

**FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTA**

---

**Nada** **Mucho**

**VERDURAS**

---

**Nada** **Mucho**

**CARNE, DERIVADOS DEL POLLO, PESCADO O HUEVOS**

---

Nada Mucho

**PRODUCTOS LÁCTEOS: como leche, queso o yogurt**

---

Nada Mucho

**HAMBRE**

¿Cómo de hambriento te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de sediento te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno sientes tu estómago justo ahora?

---

Nada Extremadamente



¿Cómo de fuerte es tu deseo de comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cuánto piensas que podrías comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno (nauseas) te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

8°) En la cama, antes de dormir.

Fecha \_\_\_\_\_

Hora \_\_\_\_\_

### APETITO

Por favor responde a estas preguntas considerando solo cómo te sientes en este preciso momento teniendo en cuenta tu apetito justo en este momento, y sin preocuparte por las calorías, la grasa o si es una dieta saludable o no.

Dime cuanto disfrutarías comiendo alimentos de cada una de las siguientes 7 categorías:

**DULCES:** (como pasteles, caramelos, galletas, helados o bollería)

---

Nada

Mucho

**COMIDAS SALADAS:** (como patatas fritas de bolsa, saladitos, frutos secos)

---

Nada

Mucho

**ALIMENTOS RICOS EN CARBOHIDRATOS:** (como pan, pasta, arroz, patatas)

---

Nada

Mucho

**FRUTAS Y ZUMOS DE FRUTA**

---

Nada

Mucho

**VERDURAS**

---

**Nada** **Mucho**

**CARNE, DERIVADOS DEL POLLO, PESCADO O HUEVOS**

---

**Nada** **Mucho**

**PRODUCTOS LÁCTEOS: como leche, queso o yogurt**

---

**Nada** **Mucho**

**HAMBRE**

**¿Cómo de hambriento te sientes justo ahora?**

---

**Nada** **Extremadamente**

¿Cómo de sediento te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno sientes tu estómago justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de fuerte es tu deseo de comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cuánto piensas que podrías comer justo ahora?

---

Nada Extremadamente

¿Cómo de lleno (nauseas) te sientes justo ahora?

---

Nada Extremadamente

# CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA

---



## Artículo

“TIMING OF CHOCOLATE INTAKE AFFECTS HUNGER,  
SUBSTRATE OXIDATION, AND MICROBIOTA: A RANDOMIZED  
CONTROLLED TRIAL”

Teresa Hernández-González, Rocío González-Barrio, Carolina Escobar, Juan Antonio Madrid, Maria Jesús Periago, Maria Carmen Collado, Frank A.J. L Scheer, Marta Garaulet

The FASEB Journal. 2021;35:e 21649.

(Índice de impacto= 4,966; cuartil: 1º)

<https://doi.org/10.1096/fj.202002770RR>





# “TIMING OF CHOCOLATE INTAKE AFFECTS HUNGER, SUBSTRATE OXIDATION, AND MICROBIOTA: A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL”

Teresa Hernández-González, Rocío González-Barrio, Carolina Escobar, Juan Antonio Madrid, María Jesús Periago, María Carmen Collado, Frank A.J. L Scheer, Marta Garaulet

## Resumen

Comer chocolate por la mañana o por la tarde/noche puede afectar de manera diferente al equilibrio energético y también al peso corporal o a la distribución de grasa corporal en mujeres postmenopáusicas mediante cambios en la ingesta energética, en la oxidación del sustrato, en variables circadianas relacionadas con el sueño, así como en la composición de la microbiota intestinal y su actividad metabólica.

En un ensayo aleatorio y cruzado, 19 mujeres postmenopáusicas, se sometieron a tres condiciones: 1) Tomar 100 g de chocolate por la mañana (MC); 2) Tomar 100 g de chocolate por la tarde/noche (EC); 3) Condición sin chocolate (N). Cada condición tuvo una duración de 2 semanas, y durante todo el estudio pudieron continuar con su dieta habitual *ad libitum* con la única excepción del chocolate.

Nuestros resultados muestran que 14 días de ingesta de chocolate no aumentó el peso corporal de las voluntarias. El consumo de chocolate disminuyó el hambre y el deseo de dulces ( $P < 0,005$ ), y redujo la ingesta de energía *ad libitum* en ~300 kcal/día durante la condición de mañana pero no compensó completamente el aporte energético extra del chocolate (542 kcal/día). El chocolate en la condición de noche aumentó la actividad física en +6,9%, la disipación de calor después de las comidas +1,3% y la oxidación de carbohidratos en +35,3% ( $P < 0,05$ ). El chocolate en la condición de mañana redujo la glucosa en ayunas (4,4%) y aumentó la oxidación de lípidos (+25,6%). El análisis de componentes principales mostró que el horario de ingesta de chocolate dio como resultado perfiles y funciones de microbiota diferenciados ( $P < 0,05$ ). El mapa de calor de la temperatura de la muñeca y los

registros de sueño muestran que el chocolate en la condición de noche produce una mejora en la regularidad del sueño, mientras que el chocolate en la condición de mañana se asocia con una mayor frecuencia de siesta (60 min vs 78 min;  $P = 0,019$ ).

En conclusión, tomar chocolate por la mañana o por la tarde/noche produce efectos diferenciales sobre el hambre y el apetito, la oxidación del sustrato, los valores de glucemia en ayunas, la microbiota (composición y función) y los ritmos de sueño y temperatura. Los resultados destacan que el "cuándo" comemos también es un factor relevante a considerar en el equilibrio energético y el metabolismo.