

# Efecto del consumo de chocolate oscuro de granos cacao sin fermentar, sobre marcadores de estrés oxidativo y, disfunción endotelial en una población sana

Mary Lares<sup>1,2</sup>, Geovanna Tafurt<sup>3</sup>, Oscar Suarez<sup>4</sup>, Clímaco Alvarez<sup>5</sup>, Sandra El Khor<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

<sup>2</sup>Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo", San Martín, Caracas, Venezuela.

<sup>3,4</sup>Universidad Nacional de Colombia, Sede Orinoquía, Arauca Colombia.

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Caucaagua, estado Miranda, Venezuela.

<sup>6</sup>Instituto Superior Tecnológico San Isidro, Azuay-Cuenca, Ecuador.

## Resumen

**E**l objetivo del estudio fue evaluar el efecto del consumo de chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar, sobre los marcadores lipídicos, glicemia, insulina, HOMA, estrés oxidativo y de disfunción endotelial en una población metabólicamente sana. Se seleccionaron 5 individuos adultos metabólicamente sanos, evaluados antes y después de 2 horas del consumo de 25g de cacao oscuro sin fermentar al 70% el cual tenía una composición de polifenoles totales  $6,37 \pm 0,08$  g ácido gálico/100 g extracto (%), capacidad antioxidante  $0,394 \pm 0,007$  mmol trolox/ g extracto. A cada sujeto en ayuno se evaluó a nivel antropométrico y bioquímico: (colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, glicemia, insulina y HOMA). Asimismo, se realizaron las determinaciones de los marcadores: de estrés oxidativo (8-isoprostano) y de disfunción endotelial (óxido nítrico). El análisis estadístico de los resultados fue un análisis de varianza de una vía a un nivel de probabilidad de  $p \leq 0,05$ . Se observó aumento estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) en el marcador de óxido nítrico a las 2 horas, posiblemente por efecto del aumento de los polifenoles presentes en el chocolate oscuro sin fermentar. Los marcadores lipídicos, glicemia, HOMA y de estrés oxidativo (8-isoprostano) permanecieron inalterados en la población estudiada. Se evidencia una disminución significativa en los niveles de insulina que van de  $12,10 \pm 1,52$  antes y  $9,80 \pm 1,89$   $\mu$ U después, y un aumento significativo del óxido nítrico de  $15,75 \pm 5,62$  antes y de  $17,74 \pm 6,24$   $\mu$ M después. Se concluye que el consumo 25g a las 2 horas de chocolate oscuro de granos cacao sin fermentar, tiene un posible efecto beneficioso sobre la salud cardiovascular, mejorando la sensibilidad a la insulina y la activación del óxido nítrico.

**Palabras claves:** Chocolate, estrés oxidativo y disfunción endotelial.

## Abstract

**T**he goal of the study was to evaluate the effect of the consumption of dark chocolate elaborated with unfermented organic cocoa beans, on lipid markers, glycemia, insulin, HOMA, oxidative stress and endothelial dysfunction of a metabolically healthy population. Five selected metabolically healthy adult individuals were evaluated before and after 2 hours of consumption of 25g of the dark chocolate at 70%. The dark chocolate had a total polyphenol composition of  $6.37 \pm 0.08$  g gallic acid/100 g extract, and an antioxidant capacity of  $0.394 \pm 0.007$  mmol trolox/g extract. Each fasting subject was evaluated at an anthropometric and biochemical level (cholesterol, triglycerides, HDL, LDL, glycemia, insulin and HOMA), as well as, the determination of markers: oxidative stress (8-isoprostane) and endothelial dysfunction (nitric oxide). Data shown a statistical significant increasing ( $p \leq 0.05$ ) on the nitric oxide marker after the 2 hours of chocolate consumption a level of  $p \leq 0.05$ . This increase is possibly due to the increase in polyphenols present in dark unfermented chocolate. However, the lipid markers, glycemia, HOMA and oxidative stress (8-isoprostane) remained unchanged in the study population. The insulin levels ranging from  $12.10 \pm 1.52$  before and  $9.80 \pm 1.89$   $\mu$ U after, and a significant increase in nitric oxide of  $15.75 \pm 5.62$  before and  $17.74 \pm 6.24$   $\mu$ M after. It is concluded that the 25g consumption at 2 hours of dark chocolate of unfermented cocoa beans has a possible beneficial effect on cardiovascular health, improving insulin sensitivity and activation of nitric oxide.

**Keywords:** Chocolate, oxidative stress and endothelial dysfunction

**E**l cacao es una de las principales fuentes de polifenoles. Estos compuestos se encuentran relacionados con la actividad antioxidante del cacao y sus subproductos. Durante el procesamiento, los granos de cacao son sometidos a diferentes etapas que pueden afectar el contenido de esos metabolitos, disminuyendo la capacidad antioxidante. Una de estas etapas donde se pierden mayor cantidad de polifenoles y capacidad antioxidante es la fermentación<sup>1</sup>.

Se ha evidenciado que el cacao y sus derivados presentan una gran variedad de propiedades beneficiosas para la salud en humanos. Algunos reportes señalan que el consumo de cacao o chocolate reduce el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares. Varios estudios en humanos han mostrado el efecto de los polifenoles del cacao en los niveles lipídicos, como una disminución en el colesterol total y regulación en la presión arterial sistólica y diastólica. También, inactivan radicales superóxido, hidroxilo y radicales lipídicos; así mismo, inhiben la peroxidación lipídica (LDL) *in vitro* e *in vivo*. Además, se ha observado el mejoramiento en la capacidad vasodilatadora de las arterias braquiales, en pacientes con enfermedad de las arterias coronarias, al suministrarles bebidas de cacao<sup>2-5</sup>.

El base a lo anteriormente planteado, el cacao sin fermentar tiene más altos niveles de polifenoles se evaluó el efecto agudo del consumo de chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar, sobre los marcadores lipídicos, glicemia, insulina, HOMA y de estrés oxidativo y de disfunción endotelial en una población metabólicamente sana.

**S**e seleccionaron 5 adultos voluntarios, metabólicamente sanos, con edades comprendidas entre 42 a 57 años. Los sujetos fueron evaluados en el Laboratorio de Investigaciones Endocrinológicas y Enfermedades Metabólicas del Hospital Militar "Dr. Carlos Arvelo" y en la Escuela de Nutrición y Dietética de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela; Con criterios previamente establecidos se excluyeron del estudio aquellos sujetos con enfermedades crónicas, diabetes, infecciones, enfermedad de origen inmunológico, obesidad tratada con cirugía, así como sujetos con un consumo habitual de bebidas alcohólicas o drogas, mujeres embarazadas, con tratamiento antiagregante

plaquetario u antioxidante y aquellos que por encuesta fueran alérgicos al chocolate. Todos los voluntarios que fueron incluidos en el estudio, firmaron el consentimiento informado, aceptando participar en el mismo. A todos los participantes que no fueron excluidos se les realizó una evaluación previa para su inclusión a fin de determinar si estaban sanos metabólicamente. Se evaluó si sus índices de masa corporal estaban comprendidos entre 18 y 29,9; y normotensos, hematología completa, insulina, cortisol, TSH y T4L estaban normales, antes de entrar al estudio. Además, se les realizó una encuesta en relación a su preferencia por el chocolate oscuro y si llevaría a cabo el estudio consumiendo 25 g de chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar, diluido en una taza de 8 onzas (240 ml) de agua caliente después de 2 horas y sin la ingesta de otro tipo de chocolate, diferente al provisto. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Militar Dr. Carlos Arvelo. Caracas, Venezuela. Los sujetos fueron instruidos cuidadosamente para mantener su dieta y abstenerse de consumir alimentos y bebidas ricos en flavonoides, incluyendo vino y otras bebidas alcohólicas. A todos los participantes del estudio les fue suministrada una lista de los alimentos y bebidas no debían consumir 72 horas antes del estudio.

El chocolate que se le suministro, para la preparación de la bebida fue realizado en la Hacienda el Cairo ubicada en Arauca, Colombia, el cual tenía una composición de 70% de licor de cacao y 12,68% de azúcares, clavo 0,23%, canela 0,16%, polifenoles totales  $6,37 \pm 0,08$  g ácido gálico/100 g extracto (%), capacidad antioxidante  $0,394 \pm 0,007$  mmol trolox/ g extracto.

#### Evaluación nutricional

La evaluación antropométrica, incluyó mediciones de peso corporal, estatura máxima y circunferencias de cintura, siguiendo la metodología del Programa Internacional de Biología<sup>6</sup>. Se utilizó balanza digital TANITA® UM-080, cinta de fibra de vidrio fijada a la pared y escuadra, y cinta antropométrica de fibra de vidrio, estrecha, flexible y no elástica. Con las medidas obtenidas se determinó el indicador: índice de masa corporal (IMC) utilizando la clasificación de la World Health Organization<sup>7</sup>.

#### Evaluación bioquímica y paramédica

Evaluación bioquímica y paramédica: se evaluaron 5 individuos adultos sanos, antes y después del consumo agudo de 2 horas de 25 g diarios de consumo de chocolate oscuro de granos cacao orgánico sin fermentar. A cada sujeto en ayuno de 14 horas se les extrajo 20 ml de sangre periférica en 4 tubos Vacutainer con EDTA y sin EDTA y fueron centrifugados a 1.000rpm por 20 minutos, y separados el suero y plasma para determinar: glicemia, colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL, colesterol-LDL por Kit comercial de Roche Diagnostico C.A. La determinación de 8-isoprostano, por kit Comercial de Endogen Human y de oxido nítrico por el método de Elisa de la casa Comercial de Cayman Se determinaron en un Lector de Microplacas Elisa Biotek Instruments, INC. A cada individuo se realizó medidas de presión arterial sistólica (PAS) y presión arte-

rial diastólica (PAD) con esfigmomanómetro de mercurio y con Dynamap con manguito de 48 x 14 cm., según técnica descrita<sup>8,9</sup>, antes y después del consumo del chocolate oscuro.

### Análisis estadístico

Para el manejo estadístico se construyó una base de datos en el programa Office Excel 2007<sup>®</sup> y utilizando sus herramientas se realizó el tratamiento estadístico que incluyó medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas, distribución de frecuencias para las cualitativas y se realizó un análisis de varianza de una vía a un nivel de probabilidad de  $p \leq 0,05$  con el uso del paquete estadístico SPSS<sup>®</sup> (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows<sup>®</sup>, versión 19.0.

La muestra de estudio estuvo conformada por 5 sujetos, 20 % representado por el género masculino y 80 % por el género femenino, con un rango de edades entre 42 y 57 años. En la Tabla 1, se observa el promedio y desviación estándar de las medidas antropométricas, presión arterial sistólica y diastólica donde se aprecia que los sujetos estudiados son normopesos y normotensos, no se observaron diferencias significativas antes y después por efecto del consumo de chocolate en la presión arterial sistólica y diastólica.

Tabla 1. Medidas antropométricas, y efecto del consumo de chocolate oscuro de granos cacao sin fermentar sobre presión arterial sistólica y diastólica en una población sana.		
Medidas antropométricas n = 5	Basal	
Edad	50,40 ± 5,94	
Peso (Kg)	66,18 ± 9,91	
Talla (mts)	1,61 ± 0,16	
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25,55 ± 2,88	
Medidas de Presión arterial	Basal	2 horas
Presión Arterial Sistolica PAS (mmHg)	114,00 ± 3,16	114,40 ± 5,56
Presión Arterial Diastolica PAD (mmHg)	69,20 ± 3,70	68,60 ± 2,19

Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar. \*Promedio seguido de letras distintas en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 2, se observa el efecto del consumo de chocolate en la glicemia, HOMA y el perfil lipídico, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros. Se observó una disminución significati-

va en los niveles de insulina que van de  $12,10 \pm 1,52$  antes y  $9,80 \pm 1,89$   $\mu$ U después, estos resultados obtenidos se corresponden con lo reportado por Lares 2012 y Lares y col, 2017<sup>10,11</sup>.

Grassi y col., en el 2005 a,b y 2008<sup>12-14</sup>, observó que la resistencia a la insulina se reduce en pacientes con hipertensión después de una dieta de 15 días con 100 g de chocolate rico en flavonoides todos los días. Por otra parte, en pacientes hipertensos con intolerancia a la glucosa, el consumo de chocolate oscuro rico en flavonoides no sólo redujo la presión arterial sino que mejoró la función endotelial, la sensibilidad a la insulina y mejoró la función de las células  $\beta$ <sup>14</sup>. En conclusión, los estudios demostraron que el chocolate oscuro rico en polifenoles disminuye y mejora la sensibilidad a la insulina.

Cordero, 2015, señala que los resultados obtenidos en su investigación han puesto de manifiesto que los flavanoles del cacao son capaces de modular el metabolismo glucídico y lipídico en las células hepáticas, mejorando la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en una situación de resistencia a la insulina y diabetes. Además, mantienen el equilibrio redox durante el estrés oxidativo que tiene lugar durante la resistencia a la insulina y diabetes<sup>15</sup>.

Hanhineva y col, 2010; Ali, y col, 2014,<sup>16,17</sup> plantean que como los compuestos fenólicos pueden modular el metabolismo glucídico de varias maneras<sup>24,27</sup>:

- inhibición de la digestión y absorción de los carbohidratos en el intestino;
- estimulación de la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ ;
- modulación de la producción de glucosa desde el hígado;
- activación de los receptores de glucosa y de la captación de glucosa en los tejidos insulino-dependientes.

En concreto, los flavanoles del cacao pueden inhibir las enzimas digestivas lipasa pancreática,  $\alpha$ -amilasa pancreática, fosfolipasa A2 y  $\alpha$ -glucosidasa implicadas en la digestión de hidratos de carbono y lípidos in vitro<sup>18,19</sup>, y por tanto, disminuir la absorción de macronutrientes y la ingesta de energía en conjunto. De manera similar, otros estudios realizados con los componentes mayoritarios del cacao, como las procianidinas y la EC, muestran efectos anti-diabéticos. La suplementación con un licor de procianidinas a ratones obesos y diabéticos disminuyó los niveles de glucosa plasmática de forma dosis dependiente<sup>20</sup>. También las procianidinas oligoméricas del cacao actuaron en el estómago de ratas alimentadas con una dieta grasa, ya que inhibieron la digestión y la absorción de los macronutrientes, o activaron el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y estimularon la función de la célula  $\beta$  y la señalización de la insulina<sup>21</sup>.

**Tabla 2. Efecto del consumo de chocolate oscuro de granos cacao sin fermentar sobre glicemia, insulina, HOMA, marcadores lipídicos, de estrés oxidativo y de disfunción endotelial en una población sana.**

Parámetros de laboratorio n = 5	Basal	2 horas
Glicemia (mg/dL)	87,04 ± 7,19	89,10 ± 7,72
Insulina (μU)	12,10 ± 1,52	9,80 ± 1,89*
HOMA	2,58 ± 0,18	2,16 ± 0,47
Colesterol Total (mg/dl)	152,45 ± 16,96	153,06 ± 14,12
Triglicéridos (mg/dl)	143,83 ± 40,97	154,84 ± 38,14
HDL-Colesterol (mg/dl)	44,44 ± 9,31	43,52 ± 9,17
LDL-Colesterol (mg/dl)	78,95 ± 12,71	80,72 ± 10,15
8-Isoprostano (pg/ml)	62,34 ± 20,52	61,38 ± 17,19
Oxido Nítrico (μM)	15,75 ± 5,62	17,74 ± 6,24*

Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar. \*Promedio seguido de letras distintas en la misma fila son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Se evidencia un aumento significativo del oxido nítrico de  $15,75 \pm 5,62$  antes de la ingesta de chocolate a  $17,74 \pm 6,24 \mu\text{M}$  después de su consumo a las 2 horas, estos resultados concuerdan con los hallazgos, de varios autores, que el flavanol del cacao aumenta la sintetasa de oxido nítrico endotelial a través de estimulación eNOS en corto plazo (2 horas después de la ingestión) y largo (después de 2 semanas de ingesta de cacao) plazo. Esto es respaldado por otro ensayo clínico que muestra estado antioxidante mejorado 2 horas después de la ingestión de 40 g de chocolate en comparación con el basal ya que el cacao induce la vasodilatación dependiente del oxido nítrico en sujetos sanos<sup>21-27</sup>.

El aumento en la producción de óxido nítrico, tras el consumo de una bebida rica en flavonoides de cacao o barra de chocolate, tiene un impacto positivo en la vasodilatación de vasos sanguíneos y mejora el flujo sanguíneo. Algunos estudios han demostrado una reducción en la presión sistólica y la presión arterial diastólica después del consumo de cacao o chocolate negro. En un estudio realizado por Taubert y col. (2003)<sup>28</sup>, indicó una reducción en la presión sistólica y diastólica en pacientes hipertensos de edad avanzada con el consumo de chocolate. En otro estudio se observó una disminución en la presión arterial durante el día y la noche, según evaluación ambulatoria realizada durante 24 horas, después de la ingesta de 100 g de chocolate oscuro rico en flavonoides, diariamente durante 2 semanas<sup>12,13</sup>. En este último estudio, la presión arterial sistólica disminuyó después del consumo de chocolate negro en 12 mmHg<sup>13</sup>.

Para explicar los posibles mecanismos de acción de los flavonoides con el metabolismo de ON y el  $\text{O}_2^-$  en las células endoteliales. Los flavonoides podrían actuar por (1) inhibiendo la enzima oxidasa NADPH dependiente de la producción de superóxido, (2) activando la enzima ONs, (3) recogiendo superóxido,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otros oxidantes que median el daño celular y (4) modificando eventos relacionados con la membrana, conduciendo a cambios en ON y producción de superóxido<sup>29</sup>.

La disfunción endotelial se caracteriza por una bioactividad menor del óxido nítrico y un deterioro de la vasodilatación, y se manifiestan mejoras en la disfunción endotelial tanto después de una ingesta simple, como con el consumo diario de una bebida de cacao rica en flavonoides<sup>30</sup>. Ésta produce elevaciones en las concentraciones plasmáticas de óxido nítrico, y se pueden identificar a la epicatequina y su metabolito, el epicatequina-7-O-glucuronido, como predictores independientes de los efectos de mejora en la microcirculación<sup>31</sup>. Lo que se relaciona con estudios que señalan que en los pacientes con enfermedad arterial coronaria, que comer alimentos ricos en flavonoides, sobre todo mejora la función endotelial. En pacientes con factores de riesgo cardiovascular, una bebida de cacao con alto contenido de flavonoides aumenta rápidamente el óxido nítrico circulante bioactivos por más de un tercio y, a su vez, aumenta la vasodilatación mediada por flujo<sup>25,32</sup>.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que el consumo de chocolate oscuro de cacao sin fermentar, con alto contenido de polifenoles totales, tiene un posible efecto beneficioso sobre la salud cardiovascular, mejorando la sensibilidad a la insulina y la activación del óxido nítrico ejerciendo una acción protectora sobre el endotelio vascular.

## Referencias

1. Del Cacao al chocolate: una industria en auge. 2017. Capítulo 7. El chocolate como alimento-funcional.-Lares,-M--Pérez,-E-y-Brito-S.-Editorial-Bellisco.-
2. Cherniack EP. Polyphenols: Planting the seeds of treatment for the metabolic syndrome. *Nutrition*. 2011;27(6):617-23.
3. Jia L, Liu X, Bai YY, Li SH, Sun K, He C, et al. Short-term effect of cocoa product consumption on lipid profile: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(1):218-25.
4. Schinella G, Mosca S, Cienfuegos-Jovellanos E, Pasamar MA, Muguera B, Ramon D, et al. Antioxidant properties of polyphenol-rich cocoa products industrially processed. *Food Research International*. 2010;43(6):1614-23.
5. Heiss C, Jahn S, Taylor M, Real WM, Angeli F, Wong ML, et al. Improvement of endothelial function with dietary flavanols in associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *J Am College Cardiol*. 2010;56(3):218-24.
6. Cameron N, Hiernaux J, Jarman S, Marshall W, Tanner J, Whitehouse R. Anthropometry. En: Weiner JS, Lourie JA, editores. *Practical human biology*. Londres: Academic Press; (1981): 27-52.
7. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000.
8. Contreras F, Rivera M, De la Parte M, Rodríguez S, Méndez O, Papapietro A. et al. Valoración del Paciente Hipertenso. *Rev Fac Med (Caracas)*. 2000; 23(1): 11-8.
9. Fragachan F, Chuki E, Sanabria A. Manual de Normas y Procedimientos para el estudio del paciente con presión arterial elevada: Hipertenso. Caracas: Editorial Olympos; 2001.

10. Lares, M., Perez, E. 2017. Effect of the dark chocolate consumption on some markers of oxidative stress, endothelial dysfunction and inflammation of a healthy population. *EC Nutrition*. 9(2):78-87.
11. Lares, M. 2012. Caracterización del cacao y su manteca durante el beneficio y evaluar el efecto del consumo de chocolate oscuro sobre marcadores de riesgo cardiovascular en una población sana. Trabajo de Ascenso a Asociado, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela
12. Grassi, D., Necozione, S., Lippi, C., Croce, G., Valeri, L., Pasqualetti, P., & Ferri, C. (2005) a. Cocoa reduces blood pressure and insulin resistance and improves endothelium-dependent vasodilation in hypertensives. *Hypertension*, 46(2),398-405.
13. Grassi, D., Lippi, C., Necozione, S., Desideri, G., & Ferri, C. (2005) b. 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*, 81(3), 611-614.
14. Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB, Ferri C. (2008). Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *Journal of Nutrition*: 138: 1671-1676.
15. Cordero Herrera, I. (2015). Mecanismos de acción de los flavanoles del cacao en las células hepáticas durante la resistencia a la insulina y la diabetes: estudio en cultivos celulares y en animales de experimentación (Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid)
16. Hanhineva, K; Törrönen, R; Bondia-Pons, I; Pekkinen, J; Kolehmainen, M; Mykkänen, H and Poutanen, K. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010. 11(4):1365-1402.
17. Ali, F; Ismail, A and Kersten, S. Molecular mechanisms underlying the potential antiobesity-related diseases effect of cocoa polyphenols. *Molecular Nutrition and Food Research*. 2014. 58(1): 33-48.
18. Gu, Y; Hurst, W J; Stuart, D A and Lambert, J D. Inhibition of key digestive enzymes by cocoa extracts and procyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011. 59(10): 5305-5311.
19. Barrett, A and Ndou, T. Inhibition of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase by tannins extracted from cocoa, pomegranates, cranberries, and grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013. 61(7): 1477-1486.
20. Tomaru, M; Takano, H; Osakabe, N; Yasuda, A; Inoue, K I; Yanagisawa, R; Ohwatari, T and Uematsu, H. Dietary supplementation with cacao liquor proanthocyanidins prevents elevation of blood glucose levels in diabetic obese mice. *Nutrition*. 2007. 23(4): 351-355.
21. Dorenkott, M R; Griffin, L E; Goodrich, K M; Thompson-Witrick, K A; Fundaro, G; Ye, L; Stevens, J R; Ali, M; O'Keefe, S F; Hulver, M W and Neilson, A P. 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): 2216-2227.
22. Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. 2003. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of Hypertension* 21 (2003): 2281-2286.
23. Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, Chiu EY, Kwak HK, Milbury P, Paul SM, Blumberg J, Mietus-Snyder ML. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *Journal of the American College of Nutrition* 23 (2004): 197-204.
24. Schroeter H, Heiss C, Balzer J, Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, Sies H, Kwik-Urbe C, Schmitz HH, Kelm M. 2006. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* .; 103: 1024 -1029.
25. Heiss C, Kleinbongard P, Dejam A, Perre S, Schroeter H, Sies H, Kelm M. Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *Journal American College of Cardiology* 469 (2005): 1276 -1283.
26. Karim M, McCormick K, Kappagoda CT. Effects of cocoa extracts on endothelium-dependent relaxation. *J Nutr*. 2000;130:2105S-2108S.
27. Hermann F, Spieker LE, Ruschitzka F, et al. Dark chocolate improves endothelial and platelet function. *Heart*. 2006;92:119-120
28. Taubert, D., Berkels, R., Roesen, R., Klaus, W. (2003). Chocolate and blood pressure in elderly individuals with isolated systolic hypertension. *JAMA The Journal of the American Medical Association*. 290(8):1029-30.
29. Galleano, M., Oteiza, P., Fraga, C. (2009). Cocoa, Chocolate, and Cardiovascular Disease. *Lournal Cardiovascular Pharmacology*. 54(6):483-490.
30. Heiss C, Finis D, Kleinbongard P, Hoffmann A, Rassaf T, Kelm M, et al. Sustained increase in flow-mediated dilation after daily intake of high-flavanol cocoa drink over 1 week. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007;49:74-80. 46. Schroeter H, Heiss C, Balzer J,
31. Kleinbongard P, Keen CL, Hollenberg NK, et al. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:1024-9.
32. Heiss C, Dejam A, 2003. Kleinbongard P, Schewe T, Sies H, Kelm M. Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. *Journal of the American Medical Association* 290 (2003): 1030 -1031.