



Universidad del Azuay

Departamento de Posgrados

Maestría en Desarrollo e Innovación de Alimentos

**ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA IN VITRO  
DE BARRAS DE CHOCOLATE AL 70%  
ENRIQUECIDAS  
CON HARINA DE SHIPALPAL**

Autor:

**Wilson Washington Lema Camas**

Directores:

**Daniel Toledo, Director**

**Marco Vélez Lazo, Co director.**

**Cuenca – Ecuador**

**2025**

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de tesis a todas las personas que han sido mi fuente de inspiración y mi apoyo constante durante este camino académico. A mi madre María Lema, por su amor incondicional, sus enseñanzas y cada sacrificio realizado. Gracias por ser el pilar de mi formación, por enseñarme el valor de la disciplina y la perseverancia, y por fomentar siempre mi deseo de aprender, superarme y a valorar mis raíces. Finalmente, dedico esta tesis a todas las personas que creen en la madre tierra, en la investigación científica y en el poder del conocimiento para transformar vidas, mejorar la salud y contribuir a un futuro más prometedor.

Con gratitud y profunda admiración.

## **AGRADECIMIENTO**

Este trabajo de tesis es el fruto de años de esfuerzo, aprendizaje y dedicación, pero, sobre todo, del apoyo incondicional de muchas personas que han sido parte fundamental de este camino. A Dios y la vida, por darme la fortaleza, la claridad y la paciencia necesarias para afrontar cada desafío con determinación y seguir adelante. A mis padres y mi familia, por su amor incondicional, su confianza en mí y su constante motivación. Gracias por ser mi inspiración, mi refugio y el motor que me impulsa a superarme cada día. A mis docentes y mentores, por compartir su conocimiento, por su orientación y por su entrega en la formación académica. A mis amigos y colegas Nicole, Margot, por su compañía, por cada palabra de aliento y por convertir este proceso en una experiencia de aprendizaje compartido. Gracias por estar presente en los momentos de esfuerzo y en los de celebración. A la Universidad hizo posible esta investigación, por brindar los recursos, el espacio y el compromiso con el desarrollo científico. Finalmente, mi gratitud a todas las personas que, de una u otra manera, han sido parte de este camino, dejando una huella imborrable en mi formación y en mi vida.

## RESUMEN:

El presente estudio evaluó la actividad antiinflamatoria *in vitro* de barras de chocolate al 70% cacao enriquecido con harina de Shipalpal (*Valeriana tomentosa kunt*). Se formularon cinco variaciones de chocolate utilizando un diseño de mezclas Centroide Simplex, ajustando las proporciones de Shipalpal y azúcar. Se analizaron sus propiedades fisicoquímicas, incluyendo fenoles, textura, color, humedad, grasa, proteína y cenizas, así como su aceptabilidad sensorial.

Los resultados evidenciaron un incremento en fenoles de hasta un 14%, en muestras con mayor contenido de Shipalpal, junto con una reducción en la producción de óxido nítrico, sugiriendo un potencial efecto antiinflamatorio. Se concluye que la incorporación de Shipalpal en chocolate es viable y beneficiosa, aunque se recomienda optimizar su textura y estabilidad sensorial para mejorar su aplicación en la industria alimentaria funcional.

**Palabras clave:** chocolate, funcional, Shipalpal, fenoles, antioxidantes, antiinflamatorio.

## ABSTRACT:

The present study evaluated the *in vitro* anti-inflammatory activity of 70% cocoa chocolate bars enriched with Shipalpal (*Valeriana tomentosa kunt*) flour. Five chocolate variations were formulated using a Centroid Simplex sample design, adjusting the proportions of Shipalpal and sugar. Their physicochemical properties were analyzed, including phenols, texture, color, moisture, fat, protein and ash, as well as their sensory acceptability.

The results showed an increase in phenols, proteins and minerals in samples with higher Shipalpal content, together with a reduction in nitric oxide production, suggesting a potential anti-inflammatory effect. It is concluded that the incorporation of Shipalpal in chocolate is feasible and beneficial, although it is recommended to optimize its texture and sensory stability to improve its application in the functional food industry.

Keywords: chocolate, functional, Shipalpal, phenols, antioxidants, anti-inflammatory.



Daniel Toledo Ochoa



# ÍNDICE DE CONTENIDO

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| CAPÍTULO 1 .....                                                  | 1  |
| Introducción.....                                                 | 1  |
| CAPÍTULO 2 .....                                                  | 3  |
| Materiales y Métodos .....                                        | 3  |
| 2.1 Muestras de Cacao ( <i>Theobroma cacao</i> ).....             | 3  |
| 2.2 Muestras de Shipalpal ( <i>Valeriana tomentosa</i> Kunt)..... | 3  |
| 2.3 Formulación y Elaboración del Chocolate con Shipalpal .....   | 4  |
| 2.4 Desgrasado de las muestras .....                              | 4  |
| 2.5 Perfil bromatológico .....                                    | 4  |
| 2.5.1 Contenido de Humedad .....                                  | 4  |
| 2.5.2 Contenido de Grasa .....                                    | 5  |
| 2.5.3 Contenido de Proteína .....                                 | 6  |
| 2.5.4 Contenido de Cenizas .....                                  | 7  |
| 2.6 Determinación del contenido fenólico total.....               | 7  |
| 2.7 Análisis de Textura.....                                      | 8  |
| 2.8 Determinación de Color.....                                   | 8  |
| 2.9 Análisis Sensorial .....                                      | 8  |
| 2.10 Análisis Celular .....                                       | 9  |
| CAPÍTULO 3 .....                                                  | 10 |
| Resultados y Discusiones .....                                    | 10 |
| 3.1 Perfil bromatológico .....                                    | 10 |
| 3.2 Contenido fenólico .....                                      | 11 |
| 3.3 Texturometría .....                                           | 12 |
| 3.4 Colorimetría.....                                             | 13 |

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.5 Análisis sensorial.....                                              | 14 |
| 3.5.1 Sabor y Aroma.....                                                 | 14 |
| 3.5.2 Textura.....                                                       | 15 |
| 3.5.3 Amargor/Dulzor .....                                               | 16 |
| 3.6 Análisis celular .....                                               | 16 |
| Conclusiones y Recomendaciones .....                                     | 18 |
| Propiedades fisicoquímicas del chocolate enriquecido con Shipalpal ..... | 18 |
| Actividad antiinflamatoria in vitro .....                                | 18 |
| Bibliografía.....                                                        | 20 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Diseño de Mezclas Centroides Simplex.....                                                     | 4  |
| Tabla 2. Características para la evaluación sensorial del chocolate. ....                              | 9  |
| Tabla 3. Composición proximal de barras de chocolate con diferentes concentraciones de Shipalpal. .... | 11 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Contenido fenólico total mediante Folin-Ciocalteu en diferentes muestras de chocolate 70%, con azúcar y Shipalpal proporcionalmente. .... | 11 |
| <b>Figura 2.</b> Análisis de Textura de las diferentes muestras de chocolate al 70%, con azúcar y Shipalpal formulado en diferentes proporciones.....      | 13 |
| <b>Figura 3.</b> Análisis de Color en muestras de chocolate al 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones.....                                 | 14 |
| <b>Figura 4.</b> Análisis del perfil sensorial del chocolate 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones. ....                                  | 15 |

|                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 5.</b> Análisis sensorial referente a textura, del chocolate 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones.....                                                                                | 15 |
| <b>Figura 6.</b> Análisis referente a intensidad del perfil sensorial del chocolate al 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones. ....                                                               | 16 |
| <b>Figura 7.</b> Niveles de producción de óxido nítrico a nivel celular en diferentes concentraciones de muestras de extractos digeridos de chocolate 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones..... | 17 |

## ÍNDICE DE ECUACIONES

|                                                     |   |
|-----------------------------------------------------|---|
| <b>Ecuacion 1:</b> Determinación de grasa .....     | 4 |
| <b>Ecuacion 2:</b> Determinación de protehina ..... | 5 |
| <b>Ecuacion 3:</b> determinación de ceniza .....    | 6 |

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de alimentos funcionales ha impulsado la creación de productos que además de nutritivos, aporten beneficios a la salud. En este contexto, el cacao (*Theobroma cacao*), rico en polifenoles y compuestos bioactivos, con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, se ha convertido en un ingrediente clave para el desarrollo de alimentos funcionales (Chire & Ureña, 2023).

Paralelamente, ingredientes tradicionales como el Shipalpal (*Valeriana tomentosa*), ampliamente utilizado en la etnomedicina andina del Ecuador, está ganando protagonismo por sus propiedades terapéuticas (FAO, 2023). La combinación de ambos en una barra de chocolate, podría representar una alternativa innovadora con valor funcional cultural (Gross et al., 2015).

Este estudio propone la formulación de un chocolate 70% cacao enriquecido con harina de Shipalpal, y evaluar su actividad antiinflamatoria *in vitro*, sentando bases para futuras aplicaciones en salud humana.

Poblet et al. (2023) ha afirmado lo siguiente: La gastritis es la inflamación de la mucosa gástrica y puede presentarse en forma aguda o crónica. Aunque a veces es asintomática, puede manifestarse con síntomas como ardor estomacal, náuseas o hemorragias digestivas.

Sus causas incluyen el consumo excesivo de alcohol, ciertos medicamentos, infecciones por *helicobacter pylori*, anemia perniciosa o reflujo biliar. Su diagnóstico requiere biopsia y su evolución puede derivar en gastritis atrófica o metaplasia intestinal (Del Ángel et al., 2022).

El cacao se distingue por su aporte de compuestos como polifenoles, flavonoides, metilxantinas como: cafeína y teobromina, que le confieren efectos antioxidantes, antiinflamatorios, cardioprotector y estimulante (Finut & fen, 2024). Es fuente natural de minerales esenciales como el magnesio, fósforo y zinc, los cuales desempeñan un papel fundamental en funciones clave del organismo, como el fortalecimiento del sistema inmunológico y la producción de energía (Planells Elena María et al., 2021).

Más allá de sus atractivas cualidades sensoriales, el consumo de cacao y sus derivados puede contribuir a la reducción de la presión arterial y generar efectos positivos en los

factores de riesgo cardiovascular, lo que amplía su potencial como alimento funcional con beneficios reales para la salud (Oracz & Nebesny, 2016).

Según la normativa del marco legal de la unión Europea, RD 1055/2003 (Reglamentación Técnico-Sanitaria sobre los productos de cacao y chocolate para la alimentación humana), el chocolate se define como un producto elaborado a partir de derivados del cacao y azúcares, que debe contener al menos un 35% de materia seca total de cacao. Dentro de este porcentaje, como mínimo un 18% debe corresponder a manteca de cacao y un 14% a cacao desgrasado en seco.

En el caso del chocolate negro, este se caracteriza por tener un contenido aún mayor de cacao, lo que se traduce en una mayor concentración de materia seca, intensificando tanto su sabor como sus propiedades nutricionales. Además de sus cualidades sensoriales, el chocolate contiene compuestos como la feniletilamina, una sustancia relacionada con la sensación de bienestar y felicidad que muchas personas experimentan al consumirlo (Chipre& Ureña, 2023).

Además, el cacao en polvo se ha convertido en la base de productos funcionales que combinan sabor, nutrición y bienestar emocional gracias a su capacidad para generar sensaciones de placer y equilibrio emocional (Greño et al., 2022).

Por otra parte, el Shipalpal (*Valeriana tomentosa* kunt) es una planta medicinal usada por las comunidades que habitan en la región andina de la misma Familia de las Valerianácea (Peter J. Houghton, 1997).

Desde 1995, se han desarrollado importantes esfuerzos para documentar, por medio colecciones botánicas y estudios etnobotánicos en distintas zonas del Ecuador, los usos ancestrales de esta planta. Estas investigaciones han incluido visitas a mercados y hierberías en las principales ciudades andinas, con el fin de verificar la identidad de las especies utilizadas por curanderos y sabios populares para tratar malestares a nivel digestivo (Cerón et al., 2006).

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Muestras de Cacao (*Theobroma cacao*)

Las muestras de cacao utilizadas en este estudio (cinco muestras con una réplica cada una) fueron proporcionadas por la empresa Hannan. Cada muestra está compuesta por un 75% de cacao del genotipo CCN51 y un 25% de cacao de la variedad Nacional, ambos sometidos a un proceso de fermentación controlada de acuerdo a estándares desarrollados por la finca Blanca Armijos, durante 10 días. Posteriormente, los granos fueron secados, tostados, descascarillados manualmente y molidos en un molino artesanal. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron refinadas durante 24 horas utilizando una refinadora (PREMIER, PG-508, Ecuador) para alcanzar la textura y homogeneidad deseadas. Tras la formulación, los chocolates resultantes fueron envasados en fundas aluminizadas y almacenados a temperatura ambiente (20 °C), garantizando su estabilidad y conservación óptima.

#### 2.2 Muestras de Shipalpal (*Valeriana tomentosa* Kunt)

Las muestras de plantas de Shipalpal (*Valeriana tomentosa* Kunt), se obtuvieron de la zona rural de la ciudad de Cuenca, en la parroquia Sayausí (-2.947272, -79.152844). La selección del área se basó en referencias etnobotánicas que indican la presencia de esta especie en ecosistemas andino (Cordero, 1989). Las muestras fueron transportadas en condiciones controladas, a 18 °C en contenedor térmico, aisladas de ambiente, hasta el taller de procesamiento de Hannan. Se procedió a la eliminación de impurezas, de forma manual, para continuar con el proceso de deshidratación a 40 °C por 8 horas utilizando un deshidratador (Ronco, FD6000VVHGEN, China). La temperatura se seleccionó con base en estudios previos que indican la estabilidad de los compuestos antioxidantes en estas (Martínez-Pinilla et al., 2015). Posteriormente se resguardaron las muestras en fundas herméticas aluminizadas a 20 °C. Las muestras se trituraron mediante un molino de cuchillas de acero inoxidable (Hamilton Beach, 80335G, China). Posteriormente, se realizó un tamizado con un tamiz de 0,45 mM, para obtener una distribución homogénea de partícula. La harina obtenida se almacenó en fundas herméticas de aluminio a 20 °C.

## 2.3 Formulación y Elaboración del Chocolate con Shipalpal

Se elaboraron cinco formulaciones de chocolate al 70% cacao con diferentes concentraciones de Shipalpal y azúcar, según un diseño de mezcla Centroide Simplex utilizando Minitab con la distribución de la Tabla 1. (Montgomery, 2017).

**Tabla 1.** *Diseño de Mezclas Centroide Simplex.*

| Orden Est | Orden Corrida | Tipo Pt | Bloques | Azúcar | Shipalpal |
|-----------|---------------|---------|---------|--------|-----------|
| 1         | 1             | 1       | 1       | 1      | 0         |
| 2         | 2             | 1       | 1       | 0      | 1         |
| 3         | 3             | 0       | 1       | 0,5    | 0,5       |
| 4         | 4             | -1      | 1       | 0,75   | 0,25      |
| 5         | 5             | -1      | 1       | 0,25   | 0,75      |
| 6         | 6             | 1       | 1       | 1      | 0         |
| 7         | 7             | 1       | 1       | 0      | 1         |
| 8         | 8             | 0       | 1       | 0,5    | 0,5       |
| 9         | 9             | -1      | 1       | 0,75   | 0,25      |
| 10        | 10            | -1      | 1       | 0,25   | 0,75      |

*Para los resultados finales se realizaron promedios entre las muestras originales con sus réplicas respectivamente.*

## 2.4 Desgrasado de las muestras

Las muestras fueron desgrasadas siguiendo el protocolo de Greño et al. (2022) con ligeras modificaciones. Se pesaron 3 g de muestra de cacao y se adicionaron 30 mL de hexano, se homogenizó, se filtró con papel filtro Whatman #1, y el filtrado se colocó en una campana de flujo laminar (ESCO, SPD 4A2, Singapur) durante 72 horas (Greño et al., 2022).

## 2.5 Perfil bromatológico

### 2.5.1 Contenido de Humedad

El contenido de humedad se determinó siguiendo el método de la AOAC 931.04. Para ello, se tomaron 5 g de muestra y se colocaron en un crisol previamente pesado. Posteriormente, la muestra fue sometida a secado en estufa a una temperatura controlada de  $103 \pm 2$  °C durante 24 horas. Finalizado este proceso, se dejó reposar en un desecador por 1 hora, permitiendo su enfriamiento en condiciones controladas. Finalmente, se realizó un pesaje final del crisol con la muestra seca (Salazar et al., 2020). Se calculó el porcentaje de humedad con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Humedad} = \left( \frac{P_i - p_f}{P_i} \right) \times 100$$

Donde:

Pi = peso inicial de la muestra en gramos antes de la prueba

pf= peso final en gramos de la muestra después de la prueba

### 2.5.2 Contenido de Grasa

Para este análisis se siguió el método establecido por la AOAC 963.15-1973. Se pesaron 2,5 g de muestra seca y se llevó a cabo un proceso de hidrólisis ácida utilizando HCl 6N. Inicialmente, la muestra se mezcló con 22,5 mL de agua desionizada caliente y, una vez alcanzada la temperatura adecuada, se añadieron 27,5 mL de ácido, manteniendo la solución en ebullición durante 15 minutos. Luego de este proceso, la muestra fue filtrada con papel filtro Whatman #1 y secada en estufa a 60 °C durante 12 horas. Posteriormente, las muestras secas fueron colocadas en dedales de celulosa y sometidas a un proceso de extracción de grasa utilizando un equipo Soxhlet (Manon, SOX406, Alemania). La extracción se llevó a cabo bajo los siguientes parámetros: 1 hora de inmersión en 50 mL de éter de petróleo, 1 hora de lavado y 15 minutos de recuperación, garantizando una extracción eficiente de los lípidos presentes en la muestra (NTE INEN 174, 1986).

El porcentaje de grasa total de la muestra original de chocolate, fue calculado de acuerdo a la Ecuación 1. (NTE INEN 174, 1986).

$$\% \text{ Grasa} = \left( \frac{PVg - PVv}{Pm} \right) \times 100$$

(Ec. 1)

Donde:

PVg: peso en gramos de vaso con grasa

PVv. Peso en gramos de vaso vacío

Pm: peso en gramos de la muestra

### 2.5.3 Contenido de Proteína

Para esta determinación se implementó el método de la AOAC 970.22. Para ello se siguieron las tres etapas del método de Kjeldahl:

**Digestión:** se pesaron 0,5 g de muestra seca y se colocaron en tubos de digestión con 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, dejándolos en reposo por 12 horas. Para facilitar la reacción, se añadieron 2,0 g de sulfato de potasio y 0,5 g de sulfato de cobre como catalizadores. Luego, los tubos fueron sometidos a un proceso de digestión térmica en un digestor (Velp Scientific, DK Heating Digester, Italia) bajo un perfil de calentamiento escalonado: 150 °C por 15 minutos, 250 °C por 20 minutos 400 °C por 120 minutos, Finalizado el proceso, las muestras se dejaron enfriar antes de continuar con la siguiente etapa. **Destilación:** Las muestras digeridas fueron sometidas a destilación utilizando 100 mL de hidróxido de sodio al 30% durante 5 minutos, junto con 100 mL de ácido bórico. El procedimiento se llevó a cabo en un destilador (Velp Scientifica, UDK 129, Italia), asegurando la correcta captura del nitrógeno liberado en la digestión. **Titulación:** Finalmente, se realizó la titulación con una solución valorada de ácido clorhídrico 0.09241 N, registrando el volumen gastado en cada muestra para el cálculo del contenido de proteínas (Forte et al., 2023).

El porcentaje de proteína total de la muestra original de chocolate, fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación (Cerit et al., 2024).

$$\% \text{ Proteína} = \left( \frac{14x(Vm-Vb)xNx Fp}{Pm} \right)$$

(Ec. 2)

Donde:

Vm. Volumen gastado en mililitros de HCl de la muestra

Vb: Volumen gastado en mililitros de HCl del blanco

N: Normalidad de HCl

Fp: Factor proteico

Pm: Peso en gramos de la muestra

#### 2.5.4 Contenido de Cenizas

Para la determinación de este parámetro se siguió el método propuesto por la AOAC 972.15. Se pesaron 3 g de chocolate en un crisol previamente tarado. Luego, el crisol con la muestra fue colocado en una mufla y sometido a 600 °C durante 8 horas, permitiendo la incineración completa de la materia orgánica. Tras este proceso, las muestras fueron enfriadas en un desecador durante 1 hora y finalmente fueron pesadas (Armenta Roncancio et al., 2023).

El porcentaje de cenizas de la muestra original de chocolate, fue calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Cenizas} = \left( \frac{CC-C}{P_m} \right) \times 100$$

(Ec. 3)

Donde:

CC: peso en gramos del crisol más cenizas

C: peso en gramos del crisol vacío

Pm. Peso en gramos de la muestra

#### 2.6 Determinación del contenido fenólico total

La cuantificación del contenido de fenoles totales se llevó a cabo empleando el método de Folin-Ciocalteu, según lo descrito por La Mantia et al. (2023), con pequeñas variaciones: se pesaron 2 g muestra de cacao desgrasado con 3,5 mL de una dilución de etanol 75%. Se centrifugo las muestras a 750 rpm durante 10 minutos, y se tomaron 100 µL del sobrenadante, los cuales se diluyeron en 3,9 mL de agua destilada. A esta solución se le añadieron 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 0,75 mL de una solución de carbonato de sodio al 20% m/v. La mezcla se mantuvo en oscuridad durante 2 horas para permitir la reacción, y posteriormente se midió la absorbancia a 760 nm utilizando un espectrofotómetro de microplacas (BioTek Epoch). El contenido de polifenoles se calculó con base en una curva de calibración generada con ácido gálico, y los resultados se expresaron en miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra (mg GAE/g).

## 2.7 Análisis de Textura

Para este análisis se determinó la dureza de las barras de chocolate mediante un Texturómetro (TA-TXT Plus C, Modelo 1SOX406, Italia) usando la sonda Warner-Blatzler con 1; 0,50 y 10 mm/seg de velocidad antes, durante y después del test respectivamente, una distancia de 10 mm de penetración y una distancia de calibración de 50 mm, los resultados fueron expresados en gramos fuerza (Zarić et al. 2024).

## 2.8 Determinación de Color

El análisis de colorimetría se llevó a cabo utilizando un colorímetro espectral (Lovibond, LC 100 y SV 100, Alemania), aplicando una metodología precisa para garantizar la uniformidad en las mediciones. Se trabajó bajo el modelo de color CIE  $L^*a^*b^*$ , con un límite de variación  $\Delta E \leq 2.0$ , asegurando una alta reproducibilidad en los resultados. Para cada muestra, se realizaron tres mediciones independientes, utilizando una iluminación estándar D65 a 10°, optimizando así la evaluación objetiva del color en las formulaciones analizadas (Das et al., 2020).

El análisis de datos se realizó mediante la determinación del índice de color aplicando la siguiente ecuación (Vignoni et al., 2006):

$$IC = \frac{a \times 1000}{L \times b}$$

IC= índice de color

L, a, b: valores dados por instrumento colorímetro

## 2.9 Análisis Sensorial

Se realizó un análisis sensorial para evaluar las características organolépticas de las muestras, para ello se conformó un panel de 100 participantes, quienes fueron previamente instruidos sobre los atributos a evaluar. Cada participante recibió una ficha de catación con una escala hedónica de 9 puntos, donde 1 representaba "me desagrada muchísimo" y 9, "me gusta muchísimo". Las muestras se almacenaron a 18 °C y se presentaron en porciones de 1 g, codificadas aleatoriamente para evitar sesgos. Además, se proporcionó agua entre cada degustación para limpiar el paladar y evitar interferencias de sabor. (Hanriender Dietlind, 2021).

**Tabla 2.** Características para la evaluación sensorial del chocolate.

| Sabor - Aroma | Textura   | Amargor | Dulzor |
|---------------|-----------|---------|--------|
| Chocolate     | Terroso   | 1-9     | 1-9    |
| Herbal        | Crujiente |         |        |
| Frutal        | Fluido    |         |        |
| Cítricos      | Viscoso   |         |        |
| Frutos Secos  | Cremoso   |         |        |
| Frutos Rojos  | Espeso    |         |        |
| Especias      |           |         |        |
| Rancio        |           |         |        |
| Moho          |           |         |        |

*La tabla presenta los parámetros que se medirán en la prueba sensorial, para algunos casos se medirá en una escala de 1 a 9.*

## 2.10 Análisis Celular

Se aplicó la metodología descrita por Serena-Romero et al., (2023). Las células Hep-G2 (hepatocarcinoma) se cultivaron en medio DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco) suplementado con 10% de suero bovino fetal 1% de antibiótico, e incubadas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora (Thermo Cientific, IHM 100-S, Estados Unidos). Una vez alcanzada la confluencia, las células se sembraron en placas de 96 pocillos, depositando 100 µl por pocillo, permitiendo su adhesión durante 24 horas. Para proceder a someter a células a estrés, el medio fue reemplazado por DMEM con 1 mM de lipopolisacárido LPS, manteniendo las mismas condiciones durante otras 24 horas. Después de 24 horas, se renovó el medio con las muestras a 50 µL por cada suspensión, y se utilizó glibenclamida (100 mM) como control positivo. La etapa de tratamiento duró 4 horas.

Finalmente, se midió la concentración de óxido nítrico en el medio con un kit de ensayo Griess (invitrogen), tomando lecturas a 540 nm en un lector de microplacas. Utilizando una curva de calibración de óxido nítrico (curva de calibración 100µM/mL, 50 µM/mL, 25 µM/mL, 12.5 µM/mL, 6.25 µM/mL, 3,125 µM/mL).

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 Perfil bromatológico

El perfil bromatológico de las barras de chocolate enriquecidas con Shipalpal en diferentes concentraciones se muestra en la Tabla 3. Los parámetros analizados se expresan en peso seco. La incorporación progresiva de Shipalpal en la formulación influyo significativamente en las propiedades fisicoquímicas del chocolate, evidenciando un incremento en los parámetros analizados. En particular, las muestras M4 y M5 presentan mayor variabilidad en los resultados de humedad y grasa atribuidas por la naturaleza higroscópica y lipídica del Shipalpal.

Un estudio realizado por Poliński et al., (2021), en el que incorpora extracto de sauco (*Sambucus nigra* L.) al chocolate, presenta valores similares y tendencia al incremento de humedad con valores que pasan de 0.30% en muestra control a 0.73% en formulación con sauco. En cuanto al contenido graso se observó una disminución de 32.91% en muestra control a 29,69% en formulación con sauco. Por otra parte, la investigación realizada por Gramza-Michałowska et al., (2021), en el que se evaluó chocolate enriquecido con extracto de té amarillo *Camellia sinensis*, presentó cambios leves en la composición bromatológica en donde el contenido de cenizas presentó una variación mínima de 1.76% en la muestra control a 1.73% en la muestra con té. En cuanto a proteína se registró un incremento de 6.52% en muestra control a 6.75% en muestra con té; y en carbohidratos, un aumento leve de 61.91% en muestra control a 62.19% en muestra con té.

Fernández et al.,( 2014.), en su estudio reporta valores similares en chocolate 70%, con un contenido de humedad de 1.72% y grasa del 38.75% valores cercanos a los de la muestra M1 en esta investigación.

Estos estudios respaldan que al agregar sólidos a la formulación de un chocolate genera variaciones en su perfil bromatológico, A mayor cantidad de sólidos añadidos mayor será la fluctuación en los parámetros.

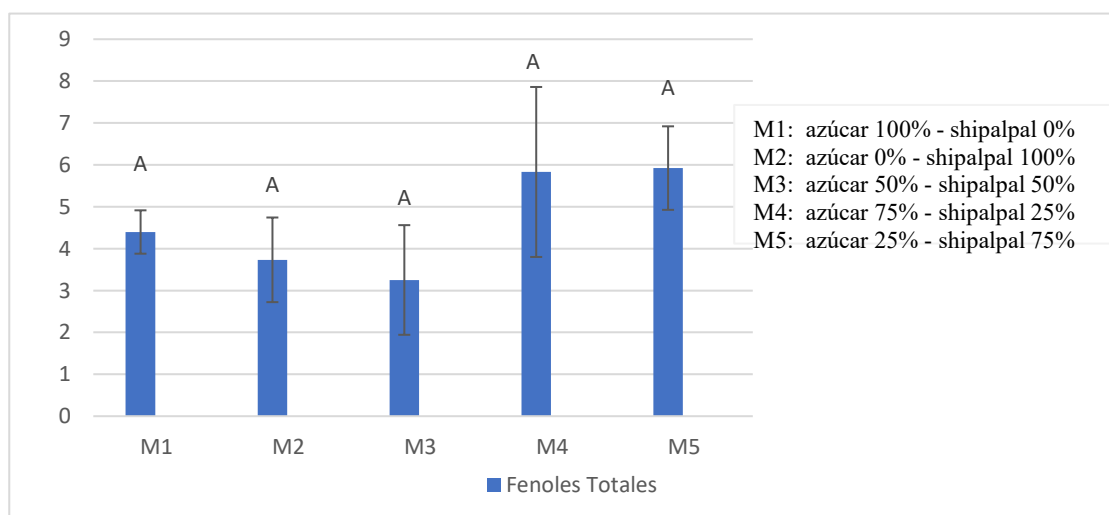
**Tabla 3.** Composición proximal de barras de chocolate con diferentes concentraciones de Shipalpal.

| Parámetros                   | Muestra    |            |            |            |            |
|------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                              | M1         | M 2        | M 3        | M4         | M5         |
| <b>Humedad</b>               | 0.92±0.07  | 1.02±0.07  | 1.05±0.10  | 1.17±0.16  | 1.28±0.09  |
| <b>Grasa</b>                 | 0.52±0.04  | 42.93±0.03 | 44.71±1.48 | 49.75±0.74 | 54.67±1.54 |
| <b>Proteína</b>              | 10.48±0.15 | 10.67±0.12 | 11.18±0.06 | 11.37±0.15 | 12.36±0.06 |
| <b>Cenizas</b>               | 2.06±0.12  | 2.20±0.03  | 2.46±0.13  | 2.78±0.03  | 3.17±0.08  |
| <b>Carbohidratos totales</b> | 46.02      | 43.18      | 40.60      | 34.93      | 28.52      |

La tabla presenta los valores proximales de cada una de las muestras donde M1: azúcar 100% - Shipalpal 0%; M2: azúcar 0% - Shipalpal 100% ; M3: azúcar 50% - Shipalpal 50%; M4: azúcar 75% - Shipalpal 25%; M5: azúcar 25% - Shipalpal 75%

### 3.2 Contenido fenólico

La Figura 1, muestra que a medida que aumenta la proporción de Shipalpal en las formulaciones, también se eleva el contenido de fenoles totales en las muestras. De acuerdo al análisis no existe diferencia significativa entre las muestras analizadas, aunque las muestras M4 6,30 mg GAE/g y M5 6,28 mg GAE/g presentan una ligera dispersión con valores similares, muestran mayor contenido de fenoles en comparación a la muestra M1 5,54 mg GAE/g solo chocolate, el incremento progresivo de fenoles sigue siendo consistente y confirma la contribución de Shipalpal a este compuesto bioactivo.



Las medidas comparten una misma letra, por lo que no existe diferencia significativa (Tukey,  $p < 0.05$ ).

**Figura 1.** Contenido fenólico total mediante Folin-Ciocalteu en diferentes muestras de chocolate 70%, con azúcar y Shipalpal proporcionalmente.

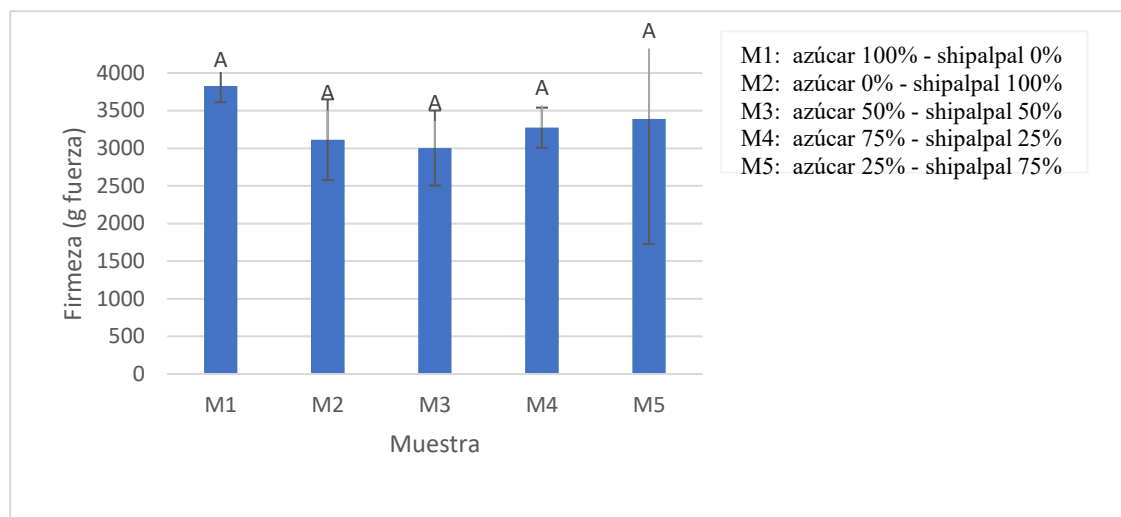
Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian una menor concentración de compuestos fenólicos en comparación con los reportados por Chire & Ureña (2023), dónde se determinó que un chocolate al 70% elaborado con cacao de la variedad nacional puede alcanzar valores promedio de hasta 22,02 mg GAE/g. En contraste, la presente investigación utilizó como base un chocolate al 70% formulado con cacao del genotipo CCN-51 obteniendo valores de 6.22 mg GAE/g, esto se debe a la variedad empleada, ya que, si bien es reconocida por su alto rendimiento y adaptabilidad agronómica, ha demostrado tener menor contenido de polifenoles, en comparación con genotipos nativos o criollos, lo cual explica la diferencia observada. Por otra parte, la investigación de Poliński et al. (2021), en la cual se utiliza extracto de hojas de sauco (*Sambucus nigra* L) para enriquecer un chocolate 70%, muestra un incremento en el contenido fenólico total de la muestra control que presentó 13.55 mg GAE/g a 18.48 mg GAE/g en muestra con extracto de sauco.

La incorporación de extractos de plantas como es el Shipalpal permitió evidenciar un incremento progresivo en los niveles de compuestos fenólicos conforme se aumenta su concentración en la formulación del chocolate.

### 3.3 Texturometría

En la Figura 2, la textura del chocolate se muestra influenciada por la cantidad de Shipalpal utilizada en las formulaciones. Se observa una disminución en la firmeza en las muestras con proporciones intermedias de Shipalpal, mientras que las formulaciones con mayor concentración recuperan parte de esa consistencia. Sin embargo, la variabilidad en la muestra M5 indica que sería conveniente ajustar y optimizar el proceso para lograr una textura más homogénea y estable en el producto final. En el estudio de Zarić et al., (2024), se reporta que la dureza de un chocolate 70% alcanza un valor de 4994 g ligeramente superior al registrado en la presente investigación, donde la muestra control M1 presentó una dureza de 3827.75 g. Por su parte la investigación de Murariu et al., (2024), evidenció un aumento moderado en la dureza del chocolate tras la incorporación del 5% de polvo de espino amarillo (*Hippophae rhamnoides* L.) pasando de 713.79 g en muestra control a 724.2 g en la muestra enriquecida. En contraste el estudio de Belščak-Cvitanović et al., (2012), reporta una disminución en la dureza del chocolate al añadir 3% de extracto de hojas de frambuesa roja (*Rubus idaeus* L.), descendiendo de 3830.5 g en la muestra control a 3782.4 g en la muestra con inclusión. Estos resultados confirman que la adición de

ingredientes vegetales puede modificar significativamente la textura del chocolate, ya sea aumentando o disminuyendo su firmeza, dependiendo de la naturaleza y concentración del compuesto añadido.



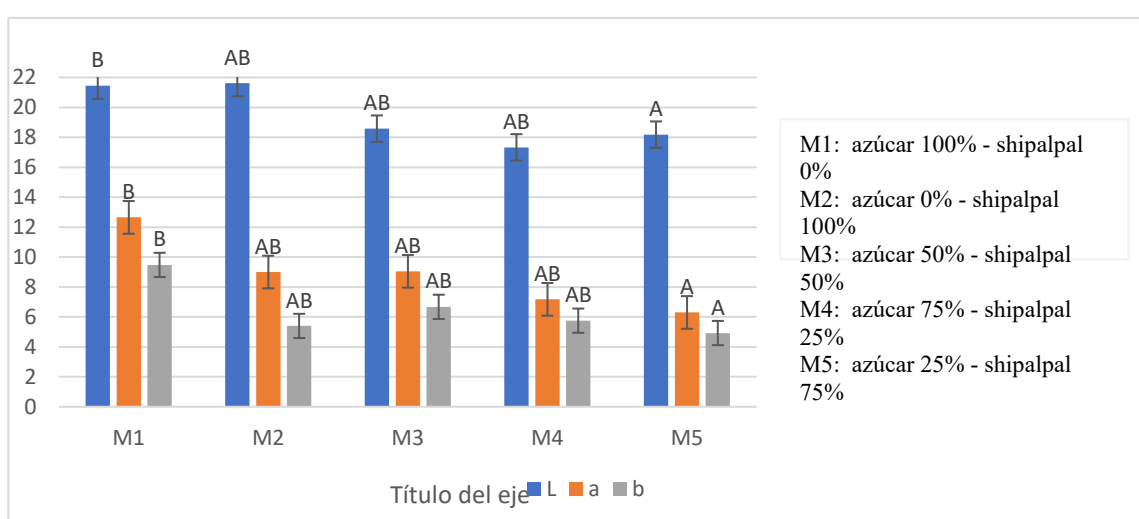
*Las medidas comparten una misma letra, por lo que no existe diferencia significativa (Tukey,  $p < 0,05$ ).*

**Figura 2.** Análisis de Textura de las diferentes muestras de chocolate al 70%, con azúcar y Shipalpal formulado en diferentes proporciones.

### 3.4 Colorimetría

En la Figura 3 se visualiza la colorimetría de cada una de las muestras desarrolladas, se revela una tendencia clara y progresiva en el espacio CIELAB. En la muestra control M1, que contiene únicamente chocolate sin adición de Shipalpal se obtuvieron valores iniciales de  $L^* = 21.45$  (luminosidad),  $a^* = 12.65$  (tono rojo) y  $b^* = 9.47$  (tono amarillo). A medida que se incrementa la proporción de Shipalpal en las muestras, estos valores disminuyen, alcanzando en la muestra M5 con la mayor concentración de Shipalpal los valores de  $L^* = 18.17$ ,  $a^* = 6.30$  y  $b^* = 4.29$ . Evidenciando reducción de luminosidad y saturación de matices rojos y amarillos. Estas variaciones pueden atribuirse a compuestos propios del Shipalpal que modifican la matriz cromática del chocolate. Por lo que el Shipalpal no solo influye en las propiedades funcionales si no también en su apariencia. Otras investigaciones demuestran que la incorporación de extractos puede modificar significativamente los parámetros de color, como ejemplo Bazyar et al. (2025), en su estudio muestra cambios de color en su formulación de chocolate con *Ganoderma Lucidum*. Pasado de los valores de  $L^* = 31.8$ ,  $a^* = 74.20$   $b^* = 12.4$  en su muestra control de chocolate sin extracto, a valores cambiantes  $L^* = 26.4$ ,  $a^* = 79.5$ ,  $b^* = 9.4$  en su muestra con

un agregado del 5% de extracto. De manera similar el estudio de, reporta también un cambio cromático en su formulación de chocolate con un 5% de polvo de *H. rhamnoides*, donde los valores pasaron de  $L^* = 44$ ,  $a^* = 5.7$ ,  $b^* = 36$  en muestra control a  $L^* = 45$ ,  $a^* = 7.6$ ,  $b^* = 34$  en la muestra tratada, mostrando ligeras modificaciones en los tonos rojos y amarillos. Abedini et al., (2023), en su estudio caracteriza un chocolate oscuro con valores  $L^* = 27.3$ ,  $a^* = 5.6$ ,  $b^* = 4.4$ , muy cercanos a los valores observados en la muestra control de esta investigación M1. Reafirmando que la adición de extractos a una formulación de chocolate genera cambios visibles en el perfil cromático.



*Letras diferentes en cada atributo indican una diferencia significativa entre las muestras (Tukey,  $p < 0.05$ ).*

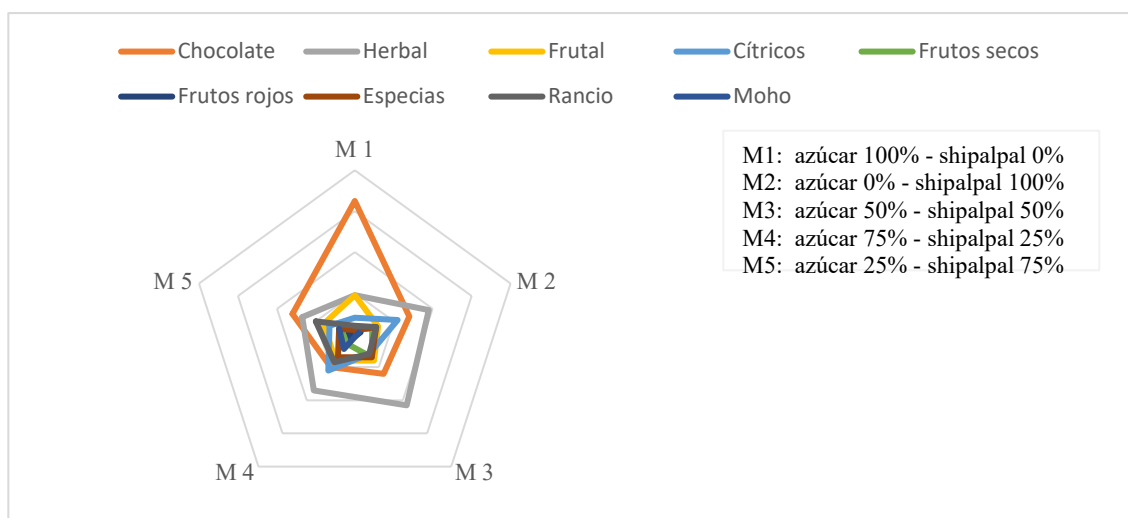
**Figura 3.** *Análisis de Color en muestras de chocolate al 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones.*

### 3.5 Análisis sensorial

#### 3.5.1 Sabor y Aroma

La Figura 4 muestra que la incorporación gradual de Shipalpal en las formulaciones altera el perfil sensorial del chocolate, resaltando las notas herbales en las muestras con mayor concentración de este ingrediente. Al inicio, las notas de chocolate son las predominantes, pero a medida que aumenta la proporción de Shipalpal, el perfil se

enriquece con matices más complejos, ofreciendo una experiencia sensorial más diversa en las formulaciones intermedias y avanzadas.

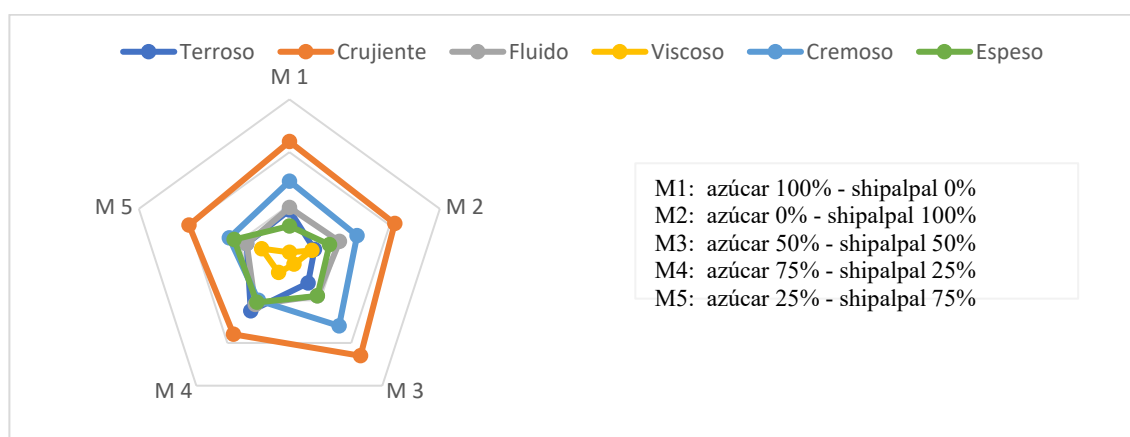


las muestras M1 y M3 presentan mayores notas a chocolate y notas herbales, inclinándose hacia los productos utilizados en la formulación.

**Figura 4.** Análisis del perfil sensorial del chocolate 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporcione.

### 3.5.2 Textura

La adición de Shipalpal tiene un impacto significativo como se muestra en la Figura 5, en la textura del chocolate, incrementando atributos como la viscosidad, el carácter terroso y el espesor en las formulaciones con mayor cantidad de este ingrediente. En cambio, las formulaciones con menos Shipalpal conservan una textura más cremosa y fluida, manteniendo las características típicas del chocolate tradicional.

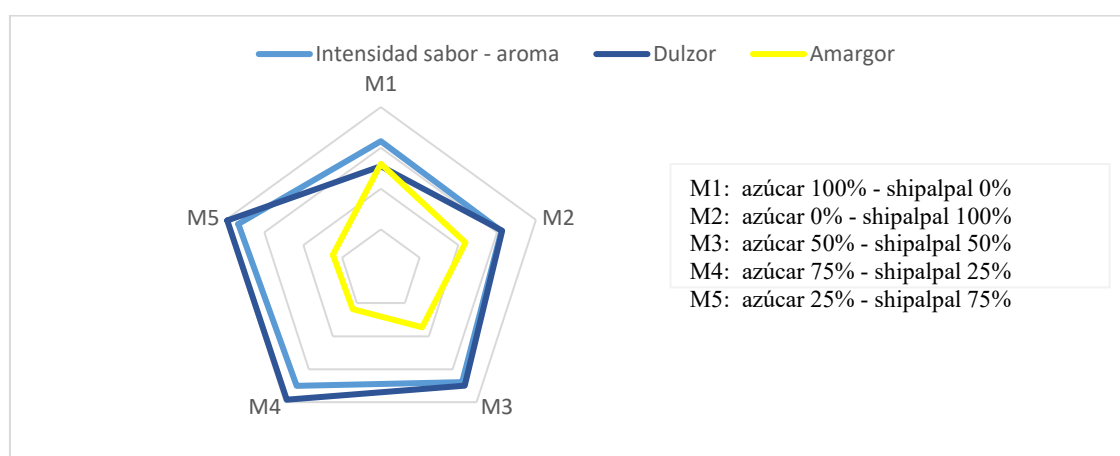


La muestra M3 muestra mayores atributos debido a la formulación con polvo de Shipalpal.

**Figura 5.** Análisis sensorial referente a textura, del chocolate 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones.

### 3.5.3 Amargor/Dulzor

El gráfico de la Figura 6, refleja cómo el perfil sensorial del chocolate cambia conforme aumenta la proporción de Shipalpal. Las formulaciones M1 y M2 destacan por su dulzor y equilibrio, manteniendo un sabor más suave y tradicional. Por otro lado, las muestras con mayor contenido de Shipalpal presentan un sabor más intenso y un marcado amargor, lo que podría resultar atractivo para consumidores que prefieren sabores más complejos y menos azucarados, alineados con una tendencia hacia productos más naturales y auténticos.

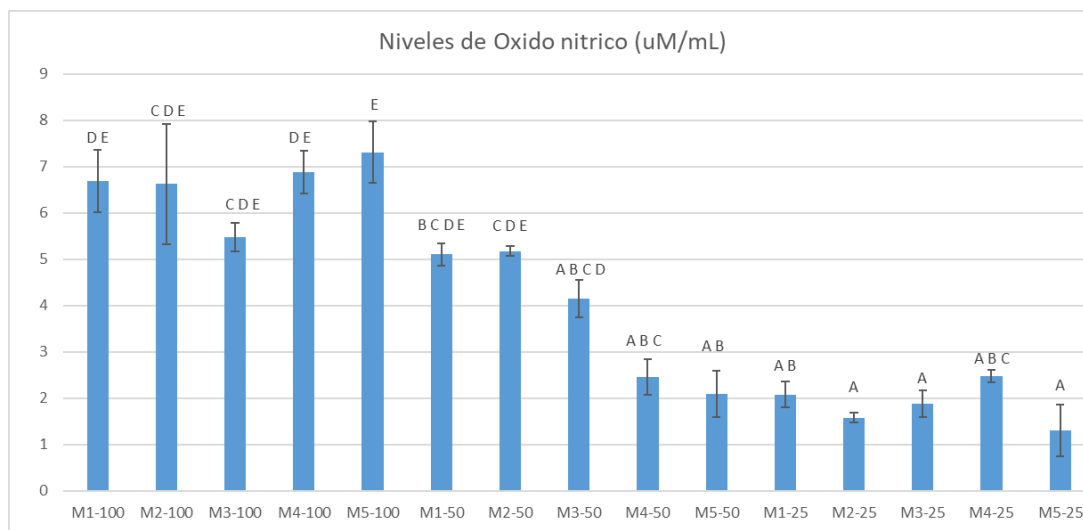


*En esta grafica podemos observar que las muestras M3, M4, M5 presentan mayor cantidad de sabores fuertes para el panel sensorial.*

**Figura 6.** Análisis referente a intensidad del perfil sensorial del chocolate al 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones.

### 3.6 Análisis celular

El gráfico en la Figura 7, muestra una reducción progresiva en la producción de óxido nítrico a medida que disminuye la concentración de las muestras. Este patrón sugiere que las formulaciones con Shipalpal podrían tener un efecto antiinflamatorio, especialmente en las concentraciones más bajas (25%), donde la producción de óxido nítrico, un marcador clave de la respuesta inflamatoria disminuye de forma notable.



*Las concentraciones 25% muestran mayor eficiencia al controlar la producción de óxido nítrico a nivel celular.*

**Figura 7.** Niveles de producción de óxido nítrico a nivel celular en diferentes concentraciones de muestras de extractos digeridos de chocolate 70%, con azúcar y Shipalpal en diferentes proporciones

Un estudio similar desarrollado por Simone et al., (2025), en el cual se complementa chocolate con garbanzos han demostrado datos interesantes en capacidad antiinflamatoria en un estudio a nivel estomacal donde se demostró lograr mejorar los niveles de protección, valores de 11 mg/ mL en muestra chocolate control a 0,49 mg/mL en el chocolate con garbanzo en los niveles de CLAUDIN1, medidas en células Caco-2. Por otro lado Bazzyar et al., (2025). En su estudio demuestra el incremento de propiedades antiinflamatorias al formular chocolate con extracto de *G. lucidum* incrementando la capacidad antiinflamatoria en muestra donde se aplicó 20% de extracto con valores de 63,65  $\mu$ g/mL, superando los valores de la muestra control que fue de 13,43  $\mu$ g/mL. Evidenciando de esta manera la capacidad de compuestos bioactivos que se pueden encontrar en el material vegetal, y que logran responder de manera eficiente en un vínculo con el chocolate.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **Propiedades fisicoquímicas del chocolate enriquecido con Shipalpal**

El estudio sobre chocolate enriquecido con Shipalpal evidenció que la incorporación progresiva de esta planta medicinal influye significativamente en las propiedades fisicoquímicas del producto. Se identificó también un incremento en la retención de humedad, asociado a la capacidad higroscópica del ingrediente, así como un mayor contenido de grasas indicando la presencia de lípidos propios del Shipalpal. Así también se registró un incremento en proteínas y cenizas, resaltando su valor nutricional, aportando minerales al perfil del producto.

Se observó un aumento en el contenido fenólico total, confirmando el potencial antioxidante del Shipalpal. En cuanto a textura, las formulaciones redujeron su firmeza, conforme incrementaba el porcentaje de Shipalpal. El color del chocolate se tornó más oscuro conforme aumentaba el Shipalpal con mayor estabilidad cromática en proporciones intermedias. Los resultados del análisis sensorial reflejaron aceptación del chocolate enriquecido con Shipalpal, con una percepción positiva en cuanto a sabor, textura y color entre las muestras M1, M2 y M3. Sin embargo, se recomienda realizar ajustes en la formulación para mejorar la experiencia de consumo, referentes a textura y sabor; y minimizar las variaciones en la textura del producto.

### **Actividad antiinflamatoria in vitro**

Este estudio demostró que las formulaciones con una mayor cantidad de Shipalpal presentaron mayores cantidades de contenido fenólico, pero concentraciones del 25% de las muestras M2 y M3 lograron una reducción significativa en la producción de óxido nítrico, lo que sugiere un potencial efecto antiinflamatorio. Este resultado respalda la incorporación de Shipalpal como un ingrediente funcional con beneficios para la salud.

Para futuras investigaciones y su posible aplicación en la industria, se recomienda perfeccionar la formulación del chocolate enriquecido con Shipalpal, enfocándose en mejorar su textura y estabilidad sensorial sin afectar sus propiedades bioactivas. Dado que las formulaciones con mayor contenido de Shipalpal mostraron variaciones en firmeza y humedad, sería conveniente ajustar procesos clave como el temperado, el conchado y el tamaño de partícula de la harina de Shipalpal, con el propósito de obtener un producto más homogéneo y con mejor aceptación sensorial. Asimismo, se sugiere llevar a cabo estudios

en modelos biológicos más avanzados, que permitan evaluar con mayor profundidad su potencial antiinflamatorio *in vivo* y su impacto en la salud humana, con el objetivo de respaldar científicamente su incorporación en la industria alimentaria funcional.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abedini, A., Dakhili, S., Bazzaz, S., Kamaladdin Moghaddam, S., Mahmoudzadeh, M., & Andishmand, H. (2023). Fortification of chocolates with high-value-added plant-based substances: Recent trends, current challenges, and future prospects. In *Food Science and Nutrition* (Vol. 11, Issue 7, pp. 3686–3705). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3387>
- Armenta Roncancio, J. E., Olarte Lopez, D. F., Rincon, J. A., & Rodriguez, M. P. (2023). Características físicas, fisicoquímicas y sensoriales de granos de cacao (*Theobroma cacao*) variedad FTA-4 cosechado en el departamento de Arauca evaluado en condiciones de fermentación y secado variables. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 17(33), 47–54. <https://doi.org/10.31908/19098367.2829>
- Bazyar, Y. Z., Rabbani, M., & Azizi, M. H. (2025). Effect of *Ganoderma lucidum* to Produce Functional Chocolate: Physicochemical, Textural and Sensory Properties. *Food Science and Nutrition*, 13(9). <https://doi.org/10.1002/fsn3.70676>
- Belščak-Cvitanović, A., Komes, D., Benković, M., Karlović, S., Hečimović, I., Ježek, D., & Bauman, I. (2012). Innovative formulations of chocolates enriched with plant polyphenols from *Rubus idaeus* L. leaves and characterization of their physical, bioactive and sensory properties. *Food Research International*, 48(2), 820–830. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.023>
- Cerit, İ., Mehdizade, K., Avcı, A., & Demirkol, O. (2024). Production of low-protein cocoa powder with enzyme-assisted hydrolysis. *Food Science and Nutrition*, 12(5), 3309–3321. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3997>
- Cerón, C. E., Herbario, M., & Paredes, A. (2006). *Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos*.
- Chire, G., & Ureña, M. (2023a). Quality aspects of a dark chocolate made with optimal formulation. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 43(2). <https://doi.org/10.12873/432chire>

- Chire, G., & Ureña, M. (2023b). Quality aspects of a dark chocolate made with optimal formulation. *Nutricion Clinica y Dietetica Hospitalaria*, 43(2), 75–81. <https://doi.org/10.12873/432chire>
- Cordero, L. (1989). *Plantas medicinales*.
- Das, S., Vishakha, K., Banerjee, S., Mondal, S., & Ganguli, A. (2020). Sodium alginate-based edible coating containing nanoemulsion of Citrus sinensis essential oil eradicates planktonic and sessile cells of food-borne pathogens and increased quality attributes of tomatoes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1770–1779. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.086>
- de Simone, G., Bonfili, L., Eleuteri, A. M., Bordoni, L., & Gabbianelli, R. (2025). Explorative Analysis of Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Intestinal Barrier Protective Effects of *In Vitro* Digested Chickpea- and Dark Chocolate-Based Snack: Insights from Caco-2 and THP-1 Cell Models. *Antioxidants*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/antiox14070823>
- Del Ángel, C., Nava, V., Gastritis, F., Cruz Del Ángel, S., & Francisco, /. (2022). *Gastritis aguda: sintomatología, diagnóstico y tratamiento*.
- Fernández, V., Yee, A., Sulbarán, B., & Peña, J. (2014). *Antioxidant activity and polyphenol content in Venezuelan commercial chocolates*.
- Finut, & fen. (2024). *El cacao, de la ciencia a la mesa*.
- Forte, M., Currò, S., Van de Walle, D., Dewettinck, K., Mirisola, M., Fasolato, L., & Carletti, P. (2023). Quality Evaluation of Fair-Trade Cocoa Beans from Different Origins Using Portable Near-Infrared Spectroscopy (NIRS). *Foods*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/foods12010004>
- Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., Skopiec, M., Kobus-Cisowska, J., & Brzozowska, A. (2021). The effect of yellow tea leaves camellia sinensis on the quality of stored chocolate confectionery. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/app11094123>

- Greño, M., Herrero, M., Cifuentes, A., Marina, M. L., & Castro-Puyana, M. (2022). Assessment of cocoa powder changes during the alkalization process using untargeted metabolomics. *LWT*, 172, 114207. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2022.114207>
- Gross, J., Guerrón Montero, C., Berti, P., & Hammer, M. (2015). Moving Forward, Looking Back: On the Frontlines of Dietary Shift in Rural Ecuador. *Íconos - Revista de Ciencias Sociales*, 20(54), 49. <https://doi.org/10.17141/iconos.54.2016.1719>
- Hanriender Dietlind, S. C. B. A. S. B. (2021). *DLG Expert report 12/2018 Practice guide for sensory panel training Part 2: Training plans for sensory assessor and panel qualification*. [www.DLG.org](http://www.DLG.org)
- La Mantia, A., Ianni, F., Schoubben, A., Cespi, M., Lisjak, K., Guarnaccia, D., Sardella, R., & Blasi, P. (2023). Effect of Cocoa Roasting on Chocolate Polyphenols Evolution. *Antioxidants*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020469>
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John Wiley & Sons, Inc.
- Murariu, O. C., Lipşa, F. D., Cârlescu, P. M., Frunză, G., Ciobanu, M. M., Cara, I. G., Murariu, F., Stoica, F., Albu, A., Tallarita, A. V., & Caruso, G. (2024). The Effect of Including Sea Buckthorn Berry By-Products on White Chocolate Quality and Bioactive Characteristics under a Circular Economy Context. *Plants*, 13(19). <https://doi.org/10.3390/plants13192799>
- NTE INEN 174. (1986). *NTE INEN 0174: Cacao en grano. Determinación del contenido de grasa*.
- Oracz, J., & Nebesny, E. (2016). Antioxidant Properties of Cocoa Beans (*Theobroma cacao* L.): Influence of Cultivar and Roasting Conditions. *International Journal of Food Properties*, 19(6), 1242–1258. <https://doi.org/10.1080/10942912.2015.1071840>
- Peter J. Houghton. (1997). *Valeriana The genus valerian*.

- Planells Elena María, Rubio Gabriel, Venegas Eva, & Llopis Juan. (2021). *El-cacao-como-fuente-de-magnesio*.
- Poblet, G. G., Tellería, P. U., Luz, M., & Pascual, C. (2023). *Gastritis y enfermedad ulcerosa péptica*. [www.aeped.es/protocolos/](http://www.aeped.es/protocolos/)
- Poliński, S., Kowalska, S., Topka, P., & Szydłowska-Czerniak, A. (2021). Physicochemical, antioxidant, microstructural properties and bioaccessibility of dark chocolate with plant extracts. *Molecules*, 26(18). <https://doi.org/10.3390/molecules26185523>
- Salazar, E., Valenzuela, R., Aguilar, M., Aranda, N., Sotelo, A., Chire-Fajardo, G. C., & Ureña, M. (2020). Physicochemical properties and microbial group behavior of postharvest peruvian cocoa bean (*Theobroma cacao* L.). *Enfoque UTE*, 11(4), 48–56. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v11n4.602>
- Serena-Romero, G., Ignot-Gutiérrez, A., Conde-Rivas, O., Lima-Silva, M. Y., Martínez, A. J., Guajardo-Flores, D., & Cruz-Huerta, E. (2023). Impact of *In Vitro* Digestion on the Digestibility, Amino Acid Release, and Antioxidant Activity of Amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) and Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) Proteins in Caco-2 and HepG2 Cells. *Antioxidants*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/antiox12122075>
- Vignoni, L. A., Césari, R. M., Forte, M., & Mirábile, M. L. (2006). Determination of Color Index in Minced Garlic. *Scientific Electronic Library Online*, 17.
- Zarić, D. B., Rakin, M. B., Bulatović, M. L., Dimitrijević, I. D., Ostojin, V. D., Lončarević, I. S., & Stožinić, M. V. (2024a). Rheological, Thermal, and Textural Characteristics of White, Milk, Dark, and Ruby Chocolate. *Processes*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/pr12122810>
- Vignoni, Lucía A, Césari, Ricardo M, Forte, Marcela y Mirabile, Mónica L. (2006). Determinación del índice de color en ajo picado. *Información tecnológica* , 17 (6),63-67. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642006000600011>

(S/f). Fao.org. Recuperado el 13 de marzo de 2025, de <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/283f7c8c-8208-4e28-90c8-d72b870e2557/content#:~:text=La%20Chakra%20Andina%20es%20un,parte%20de%20la%20poblaci%C3%B3n%20campesina>.

Bourne, M. C. (2002). Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement (2nd ed.). Academic Press.