



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERO AGROPECUARIO**

**TEMA: “SUSTITUCIÓN TOTAL DE SACAROSA POR
ERITRITOL Y STEVIA EN LA ELABORACIÓN DE
CHOCOLATE A PARTIR DE CACAO FINO DE AROMA
(*Theobroma cacao* L.)”**

AUTOR: BEDÓN TOLEDO, CAROLINA ALEXANDRA

DIRECTOR: ING. VARGAS ARBOLEDA, MARTHA, Mgs.

SANGOLQUÍ

2017



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **SUSTITUCIÓN TOTAL DE SACAROSA POR ERITRITOL Y STEVIA EN LA ELABORACIÓN DE CHOCOLATE A PARTIR DE CACAO FINO DE AROMA (*Theobroma cacao L.*)** realizado por la señorita **CAROLINA ALEXANDRA BEDÓN TOLEDO**, ha sido revisado en su totalidad y revisado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizarlo a la señorita **CAROLINA ALEXANDRA BEDÓN TOLEDO** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 18 de mayo de 2017

ING. MARTHA CECILIA VARGAS ARBOLEDA

DIRECTORA



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **CAROLINA ALEXANDRA BEDÓN TOLEDO**, con cédula de identidad N° 2100291778 declaro que este trabajo de titulación "**SUSTITUCIÓN TOTAL DE SACAROSA POR ERITRITOL Y STEVIA EN LA ELABORACIÓN DE CHOCOLATE A PARTIR DE CACAO FINO DE AROMA (*Theobroma cacao L.*)**", ha sido desarrollado considerando métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 29 de mayo de 2017

CAROLINA ALEXANDRA BEDÓN TOLEDO

C.C. 2100291778



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

AUTORIZACIÓN

Yo, **CAROLINA ALEXANDRA BEDÓN TOLEDO**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la Institución el presente trabajo de titulación **SUSTITUCIÓN TOTAL DE SACAROSA POR ERITRITOL Y STEVIA EN LA ELABORACIÓN DE CHOCOLATE A PARTIR DE CACAO FINO DE AROMA (*Theobroma cacao* L.)**", cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 29 de mayo de 2017



CAROLINA ALEXANDRA BEDÓN TOLEDO

C.C. 2100291778

DEDICATORIA

A mi Padre Celestial, mi Dios y Rey, quien ha suplido cada necesidad en mi vida, me ha dado la fuerza, la guía y el valor para salir adelante y cumplir mis metas.

A mis padres, Jaime y Mery por brindarme su apoyo y amor incondicional en cada paso de mi vida, y ser la razón por la que quiero ser mejor cada día.

A mis abuelitas Gloria y María Elina (+), por todo su amor y ayuda. A todos mis tíos, por darme la mano y apoyarme en los momentos más difíciles.

A mis maestros, quienes me han instruido a lo largo de mi carrera universitaria para ser una buena persona y buena profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios, pues todo lo que tengo y todo lo que soy es gracias a él. Su amor y fidelidad incomparables me han permitido llegar hasta aquí y alcanzar este sueño.

A mis padres y hermanos, por creer en mí y apoyarme incondicionalmente.

A mis abuelitas, a mis tíos y a toda mi familia, por darme la fuerza y el apoyo necesario para seguir adelante.

A mi mejor amiga Josselyn Velasco, por compartir su sueño conmigo y alcanzar juntas esta meta.

A mi directora de tesis, Ing. Martha Vargas y a mi maestro, Ing. Gabriel Larrea, por compartir sus conocimientos, guiarme y motivarme durante el desarrollo de mi proyecto de titulación y mi formación profesional.

Al Dr. Jorge Reyes, por permitirme el uso de las instalaciones y equipos del Departamento de Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones en Salud Pública - INSPI - Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, durante la fase de laboratorio de mi tesis.

A la Bioq. Clínica Carolina Satán, por el soporte técnico y apoyo, fundamentales para el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Bioq. Clínico Rafael Tamayo, por permitirnos el uso de los laboratorios del Departamento de Biología Molecular del INSPI y su indispensable colaboración.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|-------|
| CERTIFICACIÓN | ii |
| AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD | iii |
| AUTORIZACIÓN | iv |
| DEDICATORIA | v |
| AGRADECIMIENTO | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDO | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS | xiv |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xvi |
| RESUMEN | xviii |
| ABSTRACT | xix |
| CAPÍTULO I | |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 1 |
| 1.1 Planteamiento del problema..... | 1 |
| 1.1.1 El Problema..... | 1 |
| 1.1.2 Los Efectos | 1 |
| 1.1.3 Las Causas | 1 |
| 1.2 Antecedentes | 1 |
| 1.3 Justificación..... | 3 |
| 1.4 Objetivos | 4 |

| | | |
|-------|-----------------------------|---|
| 1.4.1 | Objetivo general | 4 |
| 1.4.2 | Objetivos Específicos | 4 |
| 1.5 | Hipótesis | 5 |

CAPÍTULO II

| | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------|
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | | 6 |
| 2.1 | Descripción botánica del cacao..... | 6 |
| 2.1.1 | Raíz..... | 6 |
| 2.1.2 | Tallo y ramas..... | 7 |
| 2.1.3 | Hojas | 7 |
| 2.1.4 | Flores | 8 |
| 2.1.5 | Fruto..... | 8 |
| 2.1.6 | Semillas..... | 8 |
| 2.2 | Generalidades del cultivo | 9 |
| 2.2.1 | Condiciones Edafoclimáticas | 9 |
| 2.2.1.1 | Altitud | 9 |
| 2.2.1.2 | Precipitación..... | 9 |
| 2.2.1.3 | Temperatura..... | 10 |
| 2.2.1.4 | Luminosidad..... | 10 |
| 2.2.2 | Requerimientos del suelo..... | 11 |
| 2.2.3 | Requerimientos nutricionales | 11 |

| | | |
|-------|-------------------------------------|----|
| 2.3 | Tipos de cacao..... | 12 |
| 2.3.1 | Cacao Criollo..... | 13 |
| 2.3.2 | Cacao Forastero | 13 |
| 2.3.3 | Cacao Trinitario..... | 13 |
| 2.4 | Cacao ecuatoriano | 14 |
| 2.4.1 | Nacional | 14 |
| 2.4.2 | CCN-51 | 14 |
| 2.5 | Componentes químicos del grano..... | 14 |
| 2.5.1 | Contenido de Grasa | 15 |
| 2.5.2 | Contenido de Polifenoles | 15 |
| 2.5.3 | Alcaloides del Cacao..... | 16 |
| 2.6 | Pre-procesamiento del cacao..... | 16 |
| 2.6.1 | Cosecha | 16 |
| 2.6.2 | Extracción de Almendras | 17 |
| 2.6.3 | Fermentación | 17 |
| 2.6.4 | Secado | 18 |
| 2.6.5 | Tostado | 18 |
| 2.6.6 | Molienda..... | 18 |
| 2.6.7 | Prensado..... | 19 |
| 2.7 | Subproductos del cacao..... | 19 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| | x |
| 2.7.1 Licor o Masa de Cacao | 19 |
| 2.7.2 Manteca de Cacao | 19 |
| 2.7.3 Polvo de Cacao | 20 |
| 2.8 Chocolate | 20 |
| 2.8.1 Elaboración de Chocolate | 21 |
| 2.8.1.1 Mezclado..... | 21 |
| 2.8.1.2 Refinado..... | 21 |
| 2.8.1.3 Conchado..... | 21 |
| 2.8.1.4 Templado | 22 |
| 2.8.1.5 Moldaje..... | 22 |
| 2.9 Edulcorantes | 23 |
| 2.9.1 Sacarosa..... | 25 |
| 2.9.1.1 Propiedades | 25 |
| 2.9.1.2 Uso..... | 26 |
| 2.9.1.3 Toxicología..... | 26 |
| 2.9.1.4 Caries dental | 27 |
| 2.9.2 Edulcorantes No Calóricos..... | 28 |
| 2.9.2.1 Eritritol | 29 |
| 2.9.2.2 Stevia | 31 |

CAPÍTULO III

| | |
|--|-----------|
| MATERIALES Y MÉTODOS | 34 |
| 3.1 Materiales, reactivos y equipos | 34 |
| 3.1.1 Utensilios y equipos para la elaboración de chocolate | 34 |
| 3.1.2 Materiales, equipos y reactivos de laboratorio para el análisis microbiológico | 34 |
| 3.2 Preparación del Chocolate | 36 |
| 3.2.1 Recolección de la Materia Prima | 36 |
| 3.2.2 Fermentación del Cacao | 36 |
| 3.2.3 Secado de las Semillas | 37 |
| 3.2.4 Selección y Tratamiento de las Muestras | 37 |
| 3.2.5 Torrefacción y Decortización | 38 |
| 3.2.6 Molienda | 38 |
| 3.2.7 Mezclado | 39 |
| 3.2.8 Templado | 40 |
| 3.2.9 Enfriamiento y Moldaje | 40 |
| 3.3 Prueba de degustación | 41 |
| 3.3.1 Tamaño de la muestra experimental | 41 |
| 3.3.2 Preparación de las muestras de chocolate | 41 |
| 3.3.3 Aplicación de la prueba de degustación | 42 |
| 3.4 Análisis microbiológico | 43 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.4.1 | Preparación de los medios de cultivo..... | 43 |
| 3.4.1.1 | Agar sangre..... | 43 |
| 3.4.1.2 | Agar MSA enriquecido (Bacitracina-Telurito-Sacarosa)..... | 43 |
| 3.4.1.3 | Infusión cerebro – corazón (BHI) | 44 |
| 3.4.2 | Recuperación de la cepa de Streptococcus mutans ATCC 25175...44 | |
| 3.4.3 | Preparación de una suspensión de Streptococcus mutans 0.5 Mc. Farland. | 45 |
| 3.4.4 | Almacenamiento y descontaminación de las muestras..... | 45 |
| 3.4.5 | Preparación de las diluciones | 46 |
| 3.4.6 | Macrodilución en caldo..... | 46 |
| 3.4.7 | Siembra de las macrodiluciones en Agar MSA enriquecido (B-T-S) 47 | |
| 3.4.8 | Recuento en placa | 48 |
| 3.5 | Análisis económico..... | 49 |
| 3.6 | Protocolo de elaboración..... | 49 |
| 3.7 | Diseño experimental..... | 50 |
| 3.7.1 | Pruebas de degustación..... | 50 |
| 3.7.2 | Análisis microbiológico | 50 |
| 3.8 | Análisis estadístico..... | 51 |
| 3.8.1 | Pruebas de degustación..... | 51 |
| 3.8.2 | Análisis microbiológico | 52 |

CAPÍTULO IV

| | |
|--|-----------|
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 54 |
| 4.1 Pruebas de degustación..... | 54 |
| 4.2 Efecto de la inhibición de chocolate edulcorado con eritritol + stevia sobre S. mutans..... | 59 |
| 4.3 Análisis de costos..... | 61 |
| 4.4 Protocolo de elaboración de chocolate con 30% eritritol + 0.3% stevia..... | 64 |

CAPÍTULO V

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 67 |
| 5.1 Conclusiones..... | 67 |
| 5.2 Recomendaciones..... | 68 |
| 5.3 Bibliografía | 69 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabla 1 | Taxonomía del Cacao | 6 |
| Tabla 2 | Cantidad estimada de nutrientes absorbidos por planta de cacao en diferentes estados de desarrollo. | 12 |
| Tabla 3 | Edulcorantes alternativos a la sacarosa..... | 24 |
| Tabla 4 | Tratamientos de chocolate edulcorados con sacarosa, eritritol y stevia | 39 |
| Tabla 5 | Niveles de la escala hedónica..... | 42 |
| Tabla 6 | Componentes de las macrodiluciones | 46 |
| Tabla 7 | Tratamientos evaluados..... | 50 |
| Tabla 8 | Macrodiluciones de los tratamientos a evaluar | 51 |
| Tabla 9 | Análisis de la varianza | 52 |
| Tabla 10 | Análisis de la varianza | 53 |
| Tabla 11 | Promedio \pm error estándar de la aceptabilidad del aroma de chocolate edulcorado con eritritol y stevia | 54 |
| Tabla 12 | Promedio \pm error estándar de la aceptabilidad de la textura de chocolate edulcorado con eritritol y stevia | 55 |
| Tabla 13 | Promedio \pm error estándar de la aceptabilidad del sabor de chocolate edulcorado con eritritol y stevia | 55 |
| Tabla 14 | Promedio \pm error estándar de la aceptabilidad del color de chocolate edulcorado con eritritol y stevia | 56 |

| | |
|---|----|
| Tabla 15 Promedio \pm error estándar de la aceptabilidad del dulzor de chocolate edulcorado con eritritol y stevia | 57 |
| Tabla 16 Promedio \pm error estándar de la aceptabilidad general de chocolate edulcorado con eritritol y stevia | 58 |
| Tabla 17 Promedio \pm error estándar de las Unidades Formadoras de Colonia por ml de muestra de chocolate edulcorado con eritritol y stevia | 59 |
| Tabla 18 Costos de elaboración de los tratamientos de chocolate (50 g) edulcorados con eritritol y stevia..... | 62 |
| Tabla 19 Precios comerciales de chocolates dark (50 g) edulcorados con sacarosa | 63 |
| Tabla 20 Precios comerciales de chocolates dark (50 g) endulzados con edulcorantes no calóricos | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Estructura química de la sacarosa..... | 25 |
| Figura 2 | Fórmula química del Eritritol | 30 |
| Figura 3 | Estructura molecular del esteviósido | 32 |
| Figura 4 | Estructura molecular del rebaudiósido..... | 32 |
| Figura 5 | Fermentación de cacao en cajas | 36 |
| Figura 6 | Secado de semillas de cacao | 37 |
| Figura 7 | Semillas impropias vs. Semillas aptas para el procesamiento..... | 37 |
| Figura 8 | Tostado y decortización de las almendras..... | 38 |
| Figura 9 | Molienda de cotiledones de cacao..... | 39 |
| Figura 10 | Templado del chocolate..... | 40 |
| Figura 11 | Aplicación de la prueba de degustación a estudiantes de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria- IASA I | 43 |
| Figura 12 | Siembra y recuperación de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 | 44 |
| Figura 13 | Preparación de la suspensión bacteriana de <i>S. mutans</i> | 45 |
| Figura 14 | Esterilización UV de las muestras en cámara de flujo laminar ... | 46 |
| Figura 15 | A) Macrodiluciones iniciales B) Macrodiluciones después de 24 horas de incubación | 47 |
| Figura 16 | Inoculación de las macrodiluciones de cada tratamiento en MSA (B-T-S) | 47 |
| Figura 17 | Identificación de las colonias en el estereomicroscopio..... | 48 |

| | |
|--|----|
| Figura 18 Colonias <i>S. mutans</i> en estereomicroscopio a un aumento de 2,00x (A) y 0,67x (B) | 48 |
| Figura 19 Diagrama de Box - Plot de la comparación entre tratamientos y aceptabilidad general. | 58 |
| Figura 20 Diagrama de barras de error de la comparación entre tratamientos y Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml) | 59 |
| Figura 21 Diagrama de Flujo de la elaboración del Chocolate | 66 |

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la sustitución de sacarosa por eritritol en chocolate de cacao fino de aroma, como una alternativa no cariogénica y baja en calóricas. La primera fase de la investigación se elaboraron cuatro formulaciones de chocolate (T0: chocolate + 30 % sacarosa; T1: chocolate + 20 % eritritol + 0.5 % stevia; T2: chocolate + 30 % eritritol + 0.3 % stevia; T3: chocolate + 40 % eritritol + 0.1 % stevia), las cuales fueron sometidas a pruebas de degustación en panelistas consumidores; encontrándose diferencias significativas entre tratamientos para los parámetros de color ($p < 0.0001$) y dulzor ($p < 0.0001$), sin diferencia estadística para la aceptabilidad general ($p = 0.502$). En la segunda fase se evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* de las formulaciones sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, a través de la técnica de macrodilución en caldo (BHI + suspensión 0.5 Mc Farland de la bacteria + solución al 10% de cada chocolate). Los tratamientos fueron sometidos a 24 horas de incubación en anaerobiosis a 35 ± 2 °C. Posteriormente estos fueron diluidos e inoculados en Agar MSA enriquecido y después de 48 horas de incubación, en las mismas condiciones, se procedió al recuento de las colonias. El análisis de las varianzas indicó diferencias estadísticas ($p < 0,001$) entre tratamientos; sin diferencias entre T0 y T3, T1 y T2. Los tratamientos 1 (20 % eritritol + 0.5 % stevia) y 2 (30 % eritritol + 0.3 % stevia), presentaron el mayor grado de inhibición con los menores índices de crecimiento bacteriano.

Palabras clave:

- **CHOCOLATE**
- **ERITRITOL**
- **STEVIA**
- ***Streptococcus mutans***

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the substitution of sucrose by erythritol in fine aroma chocolate, as a non-cariogenic and low calories alternative. In the first phase of the research, four formulations of chocolate were prepared (T0: chocolate + 30% sucrose; T1: chocolate + 20% erythritol + 0.5% stevia; T2: chocolate + 30% erythritol + 0.3% stevia; % Erythritol + 0.1% stevia), which were subjected to tasting tests in consumer panelists; (P = <0.0001) and sweetness (p = <0.0001), with no statistical difference for the general acceptability (p = 0.502). In the second phase the in vitro inhibitory effect of the formulations on the growth of *Streptococcus mutans* was evaluated through the broth macrodilution technique (BHI + 0.5 Mc Farland suspension of the bacterium + 10% solution of each chocolate). The treatments were subjected to 24 hours of incubation in anaerobiosis at 35 ± 2 ° C. Subsequently these were diluted and inoculated in enriched MSA agar and after 48 hours of incubation, under the same conditions, the colonies were counted. Analysis of the variances indicated statistical differences (p = <0.001) between treatments; without differences between T0 and T3, T1 and T2. Treatments 1 (20% erythritol + 0.5% stevia) and 2 (30% erythritol + 0.3% stevia) had the highest degree of inhibition with the lowest rates of bacterial growth.

Keywords:

- **CHOCOLATE**
- **ERITRITOL**
- **STEVIA**
- ***Streptococcus mutans***

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

1.1.1 El Problema

El chocolate elaborado con altos niveles de azúcar repercute de forma negativa en la salud humana, por lo cual muchas personas se limitan o se privan totalmente de consumirlo.

1.1.2 Los Efectos

El consumo habitual de chocolate azucarado tiene un efecto altamente cariogénico en las personas, produce aumento de peso y eleva el riesgo de desarrollar diabetes.

1.1.3 Las Causas

Dado el sabor amargo propio del chocolate, este requiere ser edulcorado en cantidades considerables. Durante muchos años la sacarosa ha sido la primera opción para este proceso por su poder endulzante, aceptación y bajo costo, sin embargo, este ingrediente es uno de los principales promotores de obesidad, diabetes y caries dental. Por otra parte, es poco conocido el efecto de otros edulcorantes no calóricos como el eritritol y la stevia en la preparación de chocolate y sus beneficios en la salud.

1.2 Antecedentes

El origen del chocolate es muy antiguo, dado que culturas ancestrales como los Aztecas y Mayas, en los años 1400 a.C. y 600 a. C. respectivamente, ya hacían uso de sus múltiples beneficios. Los aztecas utilizaron la palabra “xocolatl”, que significa “agua espumosa”, como término para identificar una bebida amarga, de fuerte sabor, y de gran valor energético proveniente de las almendras de cacao (Valenzuela, 2007).

Entre los años 900 a.C. y 250 a.C., el cacao para la cultura Maya se convirtió en una parte fundamental en su religión y estilo de vida. Incluso jugó un papel muy importante como moneda llamada “Ka’kaw”, ya que se usaba como objeto de intercambio o medio de pago (Serrano & Zambrano, 2016).

En Ecuador la producción de cacao se remonta a mediados del siglo XVI, por iniciativa de empresarios guayaquileños que se involucraron, de forma clandestina, en el manejo de este cultivo por su alta rentabilidad. En 1623 el producto ya era mercantilizado desde Guayaquil de forma ilegal, sin embargo, años más tarde el Rey Carlos IV aprobó su cultivo y explotación libre, abriendo las puertas al comercio del considerado como el mejor cacao del mundo (Montalvo, 2011).

En la actualidad, la producción de chocolate tiene una alta rentabilidad a nivel global, por lo que muchos países han incursionado en esta industria generando millones de dólares al año y plazas de empleo para miles de personas. Ecuador es uno de los principales productores de cacao del mundo, así como de chocolate, caracterizándose por tener semillas de alta calidad y excelente sabor, con gran demanda a nivel nacional e internacional. Entre los genotipos de cacao de mayor importancia económica para el país, están el cacao fino de aroma, por su exquisito sabor y aroma, y CCN-51, por su alto rendimiento.

De las almendras de cacao, previo un proceso de prensado se originan tres productos principales que son: el licor, manteca y el polvo de cacao. De la mezcla de estos se obtiene la pasta de cacao, el cual es el producto base para la fabricación de las tabletas de chocolate en sus diversos tipos (Valenzuela, 2007).

Hoy en día, el chocolate es muy popular alrededor del mundo por sus propiedades organolépticas y la gran variedad de productos en los que puede ser utilizado como confites, postres, bebidas, entre otros. Sin

embargo, los elevados niveles de azúcar añadidos en su elaboración han limitado el consumo de chocolate en un número considerable de personas; puesto que se ha comprobado que la alta ingestión de sacarosa tiene un efecto cariogénico, produce aumento de peso y el riesgo de desarrollar diabetes (Anesto, 2002).

La sustitución total o parcial de sacarosa por edulcorantes no calóricos o con bajo valor energético, ha sido una rápida respuesta a este problema como una alternativa eficiente y saludable, aceptada por los consumidores. Existe una amplia gama de edulcorantes naturales y artificiales utilizados por la industria alimenticia incluyendo la industria chocolatera; dentro de los cuales se encuentran los azúcares modificados, los polialcoholes, y ciertos endulzantes naturales no calóricos como la stevia, yacón, taumatina, entre otros (García Almeida, Casado, & García Alemán, 2013).

1.3 Justificación

El chocolate es considerado un alimento nutricionalmente completo, ya que contiene aproximadamente un 30% de grasa, 61% de carbohidratos, 6% de proteínas, 3% de humedad, minerales, vitaminas, así como diversos ácidos grasos de cadena corta, que contribuyen a la salud cardiovascular (Valenzuela, 2007). Adicionalmente, este producto obtenido de los granos de cacao, contiene aminoácidos, polifenoles, antioxidantes y compuestos orgánicos como la anandamina, que actúan como transmisores de señales nerviosas que producen felicidad (San Martín, Aulla, & Pico, 2010). Sin embargo, el chocolate ha sido calificado como cariogénico y altamente calórico, por su elevado contenido de azúcar siendo perjudicial para la salud cuando es consumido en exceso (Anesto, 2002).

Durante los últimos años, en la industria alimenticia, así como en chocolatería, se han utilizado una diversa gama de edulcorantes no calóricos para reemplazar a la sacarosa, entre ellos polioles, edulcorantes naturales como la stevia, y otros endulzantes artificiales como la sucralosa, aspartamo y sacarina (García Almeida, Casado, & García Alemán, 2013).

El eritritol y la stevia como sustitutos de la sacarosa, presentan diversas características y posibles ventajas frente a otros edulcorantes, sobre todo en el área de la salud por su mínimo contenido energético, nula intervención en los niveles de glucosa e insulina en la sangre, buena estabilidad físico-química y su naturaleza no cariogénica (Bordoni, Escobar, & Mercado, 2010). En la última década, investigaciones han comprobado que el consumo de eritritol adicionado a confites reduce el crecimiento de la placa bacteriana en la cavidad bucal, así como los recuentos orales de *S. mutans* en comparación a otros polioles como el xilitol y sorbitol (Runnel *et al.*, 2013).

En Ecuador, el uso de endulzantes no calóricos es frecuente. En chocolatería los edulcorantes más usados son fructosa y stevia, existiendo estudios de nuevos productos como el jarabe de yacón (Ponce, 2013; Serrano & Zambrano, 2016). Sin embargo, no existe información local sobre la utilización de eritritol o su combinación con stevia, en chocolate o alimentos procesados ni sus beneficios en la salud oral.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la sustitución total de sacarosa por eritritol y stevia en la elaboración de chocolate a partir de cacao fino de aroma (*Theobroma cacao* L.)”

1.4.2 Objetivos Específicos

- Determinar el grado de aceptación de los chocolates preparados con eritritol + stevia.
- Evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de eritritol + stevia adicionados a chocolate de cacao fino de aroma, sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

- Establecer los costos de elaboración de los tratamientos propuestos a nivel de laboratorio.
- Generar un protocolo de elaboración del chocolate de mejor aceptación organoléptica y control del crecimiento de *Streptococcus mutans*.

1.5 Hipótesis

Ho: El uso de eritritol y stevia en chocolate genera un producto aceptable que inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

Hi: El uso de eritritol y stevia en chocolate no genera un producto aceptable que inhibe el crecimiento de *Streptococcus mutans*.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descripción botánica del cacao

El Cacao es un árbol originario de las Selvas Amazonas, su nombre viene de la palabra maya “Ka’kaw” y su género *Theobroma* significa en griego “alimento de los dioses”. Del género *Theobroma* existen 22 especies, de las cuales *Theobroma cacao* es el de mayor importancia económica, ya que a partir del producto de sus mazorcas se obtiene chocolate (Martínez T. , 2002).

Este cultivo tiene gran importancia en el Ecuador, por ser un producto de exportación y materia prima para las industrias chocolateras locales. Tratándose a su vez de una significativa fuente de trabajo para miles de personas del campo y la ciudad (Martínez J. , 2008; Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

Tabla 1
Taxonomía del Cacao

| | |
|----------------|------------------|
| Reino | Plantae |
| Clase | Magnoliópsida |
| Orden | Malvales |
| Familia | Sterculiaceae |
| Género | <i>Theobroma</i> |
| Especie | <i>cacao</i> L. |

Fuente: (Martínez J. , 2008)

2.1.1 Raíz

Presentan una raíz pivotante o primaria aquellas plantas de cacao provenientes de semilla, este tiende a crecer hacia abajo donde su longitud

varía de acuerdo a las características físicas del suelo pudiendo alcanzar en condiciones favorables los 3 metros. Las raíces secundarias se encuentran debajo del sitio de unión de la raíz con el tallo, tomando una distribución horizontal a los 15 a 20 cm superiores de la capa arable del suelo llegando a alcanzar de 5 a 6 m a partir del tronco; estas raíces son laterales y se dividen reiteradamente tomando diferentes direcciones según los obstáculos presentes en el suelo. En plantas de propagación clonal, la raíz no es pivotante, sino que posee varias raíces principales y una mayor cantidad de raicillas absorbentes cercanas a la superficie (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.1.2 Tallo y ramas

El tronco es leñoso, de crecimiento dimórfico con brotes o chupones. En una planta proveniente de semilla, el tallo crece verticalmente y puede alcanzar de 1 a 2 m de alto a los 12 a 18 meses de edad. En este punto su crecimiento se detiene y del tallo emergen de 3 a 5 ramas de crecimiento horizontal formando un abanico, y el siguiente crecimiento vertical ocurre por un chupó que brota de la parte inferior del abanico y asciende para formar un segundo estrato de la ramificación principal. En el caso de un árbol reproducido vegetativamente como el cacao clonal o de "varetas", este no muestra un tallo único, predominando el crecimiento de ramas laterales que puede ir tomando una forma adecuada con las podas (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.1.3 Hojas

Las hojas de árboles adultos son delgadas de color verde oscuro, de tamaño mediano y de textura firme, su forma es oblonga o lanceolada-oblonga, mide de 10 a 20 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho, con ápice acuminado y nerviación penninervia. Las láminas de las hojas nuevas son blandas y flácidas de un verde muy claro pudiendo llegar a tonalidades

rojizas según la cantidad de antocianinas que genere la variedad (Martínez J. , 2008; Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.1.4 Flores

El árbol de cacao es caulífero, es decir, sus flores y frutos brotan de las partes viejas de la planta como el tronco y ramas desprovistas de hojas. Las flores brotan donde anteriormente había hojas y siempre salen del mismo lugar, por lo cual es importante cuidar los cojines florales durante la producción (Torres, 2012).

Las flores de cacao poseen ambos sexos a la vez, es decir, son hermafroditas. Su fórmula floral es $S_5, P_5, E_5 + 5, G$; lo que se traduce en cinco sépalos, cinco pétalos, diez estambres en dos verticilos de los cuales solo uno es fértil y solo el 10% de las flores polinizadas, se transforman en mazorcas (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993; Sucuzhañay, 2015).

2.1.5 Fruto

El fruto es una baya grande o mazorca, con tamaños, colores y formas distintos según la variedad. Llega a medir de 15 a 30 cm de largo por 7 a 10 cm de ancho con terminación puntiaguda y camellos longitudinales. Por lo general cada mazorca contiene en promedio de 30 a 40 semillas dispuestas en placentación axial, e incrustadas en una masa de pulpa sobre la testa de las semillas (Braudeau, 1975).

2.1.6 Semillas

Las almendras o semillas del cacao están recubiertas por una pulpa de sabor dulce y ácido llamada arilo o mucílago, más conocido como “baba” en el Ecuador. El tamaño, forma y color de la semilla varía de acuerdo al genotipo de cacao, dentro de ciertos límites. La testa o cáscara de la semilla es gruesa, de cutícula dura dentro de la cual se hallan dos cotiledones que protegen al embrión y sirven de reserva energética por algunos días después de la germinación. Los cotiledones se encuentran rodeados por el

endospermo, la cual se trata de una película muy fina conocida como “alas de abeja”. Las sustancias orgánicas y minerales que contienen los cotiledones constituyen el producto de interés comercial del cual se derivan el licor, la manteca y el polvo de cacao (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.2 Generalidades del cultivo

2.2.1 Condiciones Edafoclimáticas

El adecuado desarrollo y rendimiento de las plantas de cacao, se relacionan íntimamente con las condiciones medioambientales del sitio donde se va a cultivar, así como el manejo dado a las mismas. Los factores climáticos como la temperatura, humedad y luminosidad, influyen directamente sobre la época de floración, fructificación y cosecha; por lo cual es de vital importancia conocer las condiciones óptimas para el cultivo y manejar calendarios agroclimáticos que permitan alcanzar los índices de producción esperados (Torres, 2012).

2.2.1.1 Altitud

El cacao se cultiva desde los 0 msnm, sin embargo, las plantaciones que se desarrollan en la zona ecuatorial crecen con normalidad en altitudes mayores a los 1000 msnm hasta los 1400 msnm; observándose valores adecuados de fertilidad, temperatura, humedad, precipitación, viento y energía solar que contribuyen a la obtención de buenos rendimientos, por lo que la altitud constituye un factor secundario (Torres, 2012).

2.2.1.2 Precipitación

La planta de cacao es muy sensible a la escasez de agua, así como al encharcamiento, por lo cual es muy importante un adecuado suministro y manejo del agua para que el cultivo realice sus procesos metabólicos con normalidad (Torres, 2012).

El cultivo de cacao demanda abundante humedad y una precipitación anual que oscile entre los 1200 y 2500 mm bien distribuidos, y con un mínimo de lluvia mensual promedio igual a 100 mm. En lugares donde las sequías son prolongadas se recomienda aplicar un sistema de riego para así mantener la producción estable (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.2.1.3 Temperatura

Según Suárez *et al.* (1993), la temperatura es un factor sumamente importante para un adecuado desarrollo del árbol de cacao, ya que se conoce que las fluctuaciones estacionales diarias influyen directamente sobre los procesos fisiológicos más importantes de la planta como la floración y fructificación.

Para un adecuado crecimiento, se requiere una temperatura media anual de 21°C, una óptima de 25 °C, donde la mínima diaria debe ser 15°C y la mínima absoluta de 10°C. Temperaturas mayores a los 22°C favorecen la formación abundante de flores y frutos, en el caso de brotación regular de yemas y hojas nuevas el máximo debe ser 28°C y, la variación entre el día y la noche no debe ser mayor a 9°C (López, 2000).

Según Gonzales (2015), la absorción del agua y de los nutrientes por las raíces está regulada por la temperatura. Es importante destacar que en el cacao la actividad de las raíces disminuye a temperaturas menores de 15°C, mientras que las altas temperaturas limitan la capacidad de absorción de las raíces superficiales, por lo que es recomendable contar con la presencia de hojarasca sobre la superficie del suelo.

2.2.1.4 Luminosidad

La energía radiante del sol tiene dos efectos principales que son iluminar y elevar la temperatura. Los efectos luminosos del sol están relacionados fundamentalmente con la fotosíntesis, movimiento de los estomas y la elongación de las células de ciertos tejidos vegetales incluyendo procesos complementarios. En etapas de establecimiento del cultivo se recomienda la

asociación con otros árboles con el fin de proporcionarle sombra, ya que las plantas de cacao en estas fases son muy susceptibles a la acción de los rayos solares. En la mayoría de sitios de producción de cacao en el Ecuador las horas de brillo solar oscilan entre 800 a 1.000 horas/año. Se considera que una intensidad lumínica menor al 50% del total de luz limita los rendimientos, mientras cuando esta es superior al 50% los aumenta (Ártica, 2008; Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.2.2 Requerimientos del suelo

Para que un suelo ofrezca las condiciones óptimas para establecer una plantación de cacao, este debe reunir las siguientes características como: estructura porosa que permita la infiltración y percolación rápida del agua, adecuada aireación y fácil penetración de las raíces; una textura que puede variar de arcillosa agregada hasta franco-arenosa; consistencia suave y grumosa; así como suelos planos con una ligera inclinación para evitar el encharcamiento. Los suelos más apropiados son los suelos aluviales, francos y profundos con subsuelo permeable, así como suelos negruzcos que contienen menor cantidad de lixiviados (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993; Torres, 2012).

Según Suárez *et al.* (1993), para el cultivo de cacao no se deben tomar en cuenta a aquellos suelos que tienen mal drenaje o frecuente presencia de fragmentos de rocas y grava o arena gruesa; o aquellos con color pálido, gris o blanco y consistencia compacta, ya que esto limita la buena aireación requerida por el sistema radical.

2.2.3 Requerimientos nutricionales

En una investigación realizada en Malasia, se estimó las exigencias de nutrientes en diferentes etapas de desarrollo del cacao a través del análisis de toda la planta (Tabla 2).

Tabla 2
Cantidad estimada de nutrientes absorbidos por planta de cacao en diferentes estados de desarrollo

| Estado del cultivo | Edad de la planta (meses) | Requerimiento nutricional promedio en kg/ha | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------|---|-----|-----|-----|-----|------|------|
| | | N | P | K | Ca | Mg | Mn | Zn |
| Vivero | 5 a 12 | 2.4 | 0.6 | 2.4 | 2.3 | 1.1 | 0.04 | 0.01 |
| Establecimiento | 28 | 136 | 14 | 156 | 113 | 47 | 3.9 | 0.5 |
| Inicio de la producción | 39 | 212 | 23 | 321 | 140 | 71 | 7.1 | 0.9 |
| Plena producción | 50 a 87 | 438 | 48 | 633 | 373 | 129 | 6.1 | 1.5 |

Fuente: (Thong y NG, citados por Suárez *et al.*, Manual del cultivo de cacao. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP, Manual n° 25, 1993).

Los resultados de este estudio muestran la alta demanda de nutrientes del cultivo pues la cantidad extraída por planta está directamente relacionada con su estadio de desarrollo. Los elementos que más absorbe son: potasio, nitrógeno y calcio; de los cuales el potasio es requerido en mayores cantidades, salvo en los primeros meses. El fósforo y magnesio son asimilados en cantidades más pequeñas y la absorción de manganeso y zinc es aún menor (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.3 Tipos de cacao

Existen tres grandes grupos genéticos de cacao: Criollo, Forasteros y Trinitarios. Sin embargo, recientes estudios moleculares confirman la amplia diversidad genética de la especie, excluyendo al Cacao Nacional de esta clasificación (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013).

2.3.1 Cacao Criollo

Dentro de este grupo se encuentran los genotipos con almendras que contienen cotiledones de color blanco marfil o violeta tenue, provenientes de América Central principalmente en países como México, Colombia y parte de Venezuela. Este tipo de cacao se caracteriza por tener flores de color rosa pálido, mazorcas de color rojo o amarillo en la madurez con surcos profundos y rugosos. Requieren una fermentación corta de 2 a 3 días y es muy aromático (Arguello, Mejía, & Palencia, 2000; Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.3.2 Cacao Forastero

Estos genotipos corresponden a los llamados cacaos corrientes de Brasil, los cuales se cultivan en el oeste africano. Tienen su origen en la alta Amazonía, la zona localizada entre los ríos Putumayo, Napo y Caquetá en Suramérica se considera como el centro genético de este tipo de cacao. Los cotiledones de este grupo son púrpura oscuro, las mazorcas son amarillas en la etapa de madurez con surcos y rugosidades, son más lisas y de extremo redondeado. La cáscara de la mazorca es relativamente gruesa por su mesocarpo muy lignificado. Sus granos tardan de 4 a 6 días en fermentar (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993).

2.3.3 Cacao Trinitario

Según Braudeau (1975), este tipo de cacao pertenece a un grupo botánicamente complejo, conformado por una población híbrida polimorfa originaria de la Isla de Trinidad, manifestándose en estos genes de cacaos criollos y forasteros. Las mazorcas son rojas en estado inmaduro y amarillas en la madurez. Sus semillas al ser procesadas generan un sabor a chocolate muy pronunciado, acompañado en casos por sabores ligeramente frutales.

2.4 Cacao ecuatoriano

2.4.1 Nacional

El Cacao Nacional es conocido como sabor arriba o fino de aroma, constituyéndose como el producto emblemático del Ecuador por sus características distintivas de aroma y sabor muy cotizadas por los fabricantes de los chocolates. Representa únicamente el 5% de la producción mundial y es utilizado en todos los chocolates refinados. Sus almendras son de color morado claro con mucílago poco abundante. La pulpa o mucílago tienen un sabor más dulce frente a los tipos Trinitarios y Forasteros que son levemente ácidos. El sabor de la semilla presenta un sabor ligero amargo con muy poca astringencia (Suárez, Moreira, Vera, & Vera, 1993). Según análisis moleculares realizados, el Cacao Nacional es genéticamente más cercano a los cacaos de tipo Forastero que al grupo de los Criollos (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013).

2.4.2 CCN-51

Este genotipo de cacao se caracteriza por ser un cultivo precoz pues los inicios de su producción se dan a los 24 meses de edad, no necesita polinización cruzada para tener buen fructificación en relación a la mayoría de clones, y es tolerante a la “Escoba de Bruja”, una de las principales enfermedades que afectan el cultivo de cacao. Su nombre significa Colección Castro Naranjal, declarada en el 2005 como un bien ecuatoriano de alta productividad. Las mazorcas son de color rojizo durante su desarrollo y madurez. Es un clon cosmopolita que se adapta a casi todas las zonas tropicales, con un alto porcentaje de manteca (54%) que lo hace cotizado por las industrias (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013).

2.5 Componentes químicos del grano

Los principales constituyentes químicos de las semillas de cacao son: agua, grasa, compuestos fenólicos, materia nitrogenada como proteínas y purinas, así como almidón y otros carbohidratos. Sin embargo, el contenido

de dichos componentes varía según el tipo de cacao, su origen geográfico, grado de madurez, y de los procesos de fermentación y secado a los que han sido sometidos (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013).

2.5.1 Contenido de Grasa

Según Wakao, citado Díaz *et al.* (2013), las semillas frescas contienen usualmente entre el 50 a 55% de grasa y posterior al proceso de tostado en el licor de cacao, dicho contenido oscila entre 48 y 52%. La porción grasa de los granos está constituida principalmente por ácidos grasos como el ácido esteárico, oleico, láurico y palmítico, así como otros de cadena corta que favorecen el adecuado funcionamiento del sistema cardiovascular

2.5.2 Contenido de Polifenoles

Algunas plantas como el cacao poseen polifenoles, que son moléculas heterogéneas que poseen en su estructura grupos hidroxilos (OH), los cuales contribuyen en el control de microorganismos que puedan invadirlas. Cabe mencionar que, a su vez, las almendras de cacao poseen un alto porcentaje de polifenoles (10% del peso del grano seco), especialmente de tipo flavonoide como las procianidinas, catequinas y epicatequina entre los más importantes. Estos compuestos participan activamente en las modificaciones bioquímicas en el interior de las almendras durante la fermentación. La oxidación enzimática de los polifenoles disminuye la astringencia y amargor de las almendras, favoreciendo la calidad sensorial del cacao (Calderón, 2002; Sánchez & Acosta, 2007).

Por otro lado, diversas investigaciones han comprobado que los polifenoles presentes en el cacao poseen un mecanismo de acción que impide el desarrollo de *Streptococcus mutans* que inhibe la enzima glucosiltransferasa, evitando la adherencia microbiana y en el avance de la caries dental. Otros flavonoides como las catequinas también pueden alterar la estructura de la membrana celular de dicha bacteria inactivando y bloqueando su función (Sucuzhañay, 2015).

2.5.3 Alcaloides del Cacao

La teobromina y la cafeína son alcaloides purínicos, los cuales representan más del 99% de los alcaloides presentes en el cacao. La concentración final de ambos está determinada por el genotipo, grado de madurez y nivel de fermentación de las almendras. La presencia de estos compuestos se reducen entre el 20 al 30% durante el proceso de fermentación, disminuyéndose gran parte del amargor de las semillas (Camino, 2014).

Se conoce que la cafeína tiene efectos estimulantes sobre el sistema nervioso autónomo, ya que genera el estado de vigilia y resistencia a la fatiga, así como también es conocido por tener un efecto vasodilatador sobre el corazón. En el caso de la teobromina, esta tiene un efecto muy similar a la cafeína en menor proporción y actúa como diurético (Camino, 2014).

2.6 Pre-procesamiento del cacao

Según INIAP (2009), el pre-procesamiento o beneficiado del cacao se refiere a la preparación de las almendras que incluye una serie de actividades previas a su industrialización o comercialización. Dentro de dichas operaciones se encuentra la cosecha, extracción del grano, fermentación y secado de las semillas; de las cuales depende de forma importante en la calidad del producto.

2.6.1 Cosecha

Es el proceso que consiste en la recolección de las mazorcas sanas y maduras. Existen diversas formas de verificación como el color amarillento de las mazorcas según la variedad o el sonido al golpearla ligeramente, sugiriendo algo suelto en el interior. Generalmente esto ocurre a los 5 o 6 meses después de la fecundación de la flor (INIAP, 2009).

2.6.2 Extracción de Almendras

Se realiza de forma manual partiendo la mazorca con un mazo de madera o un machete, en la sección media o inferior de modo que las semillas caigan y puedan permanecer unidas al vástago central. Los granos se extraen con ayuda de los dedos, deslizándolos a lo largo de la placenta (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013).

2.6.3 Fermentación

Según INIAP (2009), la fermentación es el proceso de transformación de los azúcares del mucílago en alcohol etílico mediante la acción de levaduras por la combinación balanceada de factores como acidez, humedad y temperatura. El alcohol se convierte en ácido acético por la intervención de bacterias acéticas y lácticas, dicho compuesto ingresa al interior de los cotiledones produciendo su muerte y con ello la liberación de los polifenoles, proteínas de reserva, así como la generación de los atributos organolépticos propios del cacao y el chocolate. Las almendras con un mal o insuficiente proceso de fermentación producen lotes de cacao con una calidad sensorial baja.

Existen diferentes sistemas de fermentación, los cuales varían de país a país, así como por el volumen de cacao cosechado; cuando se trata de grandes volúmenes el proceso se vuelve complejo y costoso. Por lo general, la mayoría de productores alrededor del mundo utiliza la fermentación por cajas o sacos, cubriendo las semillas con hojas de plátano a un mismo nivel o tipo escalera, con la remoción de las semillas a mitad del ciclo para uniformizar la temperatura. Durante los primeros días del proceso la masa alcanza temperaturas mayores a los 30°C, subiendo gradualmente a 45°C hasta llegar a los 50°C (INIAP, 2009; Torres, 2012).

El tiempo de fermentación se relaciona con la cantidad de pulpa y la concentración de polifenoles contenidos en las almendras, lo cual varía según el genotipo de cacao. El cacao de tipo Nacional necesita un tiempo

más prolongado en relación al cacao Criollo que usualmente tarda tres días, mientras que para los cacaos de tipo Forastero tarda hasta siete días (INIAP, 2009).

2.6.4 Secado

El secado tiene como objetivo eliminar gran parte de la humedad interna bajándolo a un 7% de humedad interna, para evitar la acción de agentes patógenos que pueden alterar la calidad del grano. Esto se puede realizar de manera natural al calor y rayos del sol, o de forma artificial utilizando una secadora mecanizada; lo cual no es muy recomendable porque produce un secado muy rápido y la penetración de humo en las almendras. Este proceso puede tardar de 2 a 3 días, dependiendo de las condiciones climáticas del sitio de secado (Ártica, 2008).

2.6.5 Tostado

Según Agell (2000), el tostado o torrefacción tiene como objetivo principal desarrollar el aroma y el sabor del cacao. Este proceso se aplica con mayor intensidad sobre aquellas almendras destinadas a preparar polvo de cacao, y más suave para los granos destinados al chocolate. La torrefacción dura de 20 a 40 minutos y se realiza una temperatura constante entre 100 y 150°C. Este proceso además permite una disminución del grado de humedad, la evaporación de los ácidos volátiles, la descontaminación microbiana de los granos y facilita el descascarillado de las semillas.

2.6.6 Molienda

Los cotiledones desnudos se pasan a través de molinos de alta velocidad que reducen el tamaño de las partículas modificando su textura. Durante este proceso se genera calor por la fricción (alrededor de 32°C), lo cual hace que se funda la manteca de cacao dando origen a la pasta o licor de cacao. El licor de cacao es una masa suntuosa de color café oscuro, aroma y gusto potente que se solidifica al mermar su temperatura (Agell, 2000).

2.6.7 Prensado

El licor de cacao debe pasar por un proceso para separar la masa de la manteca, para ello tradicionalmente se utilizan prensas hidráulicas de 40 a 50 MPa. El prensado consiste en presionar la pasta de cacao poco a poco hasta que se libere el contenido graso de la mezcla, luego se extrae la pasta de cacao en forma de pastilla, la cual podrá ser utilizada en la elaboración de chocolate. (Guerrero *et al.*, 2013).

2.7 Subproductos del cacao

2.7.1 Licor o Masa de Cacao

Este subproducto se genera a partir de la molienda de los cotiledones del cacao, de consistencia pastosa y color marrón muy oscuro, con olor y sabor penetrantes. Existen dos tipos de licor de acuerdo al fin de uso, estos son: licor para prensado y licor para chocolate. En el licor para prensado se realiza una separación para obtener la torta de cacao y la manteca; la torta es utilizada para obtener polvo de cacao previo un proceso de molienda, la cual es almacenada y empacada al igual que la manteca (Guerrero *et al.*, 2013).

2.7.2 Manteca de Cacao

La manteca de cacao se encuentra presente en las almendras en una proporción cercana al 50% y se considera como el elemento más valioso del chocolate. Esta se obtiene a partir del proceso de prensado que separa la manteca de la pasta de cacao (Guerrero *et al.*, 2013).

El tipo de proceso de extracción de la manteca puede afectar la calidad de la manteca, por ejemplo un severo proceso de alcalización puede alterar sus características de solidificación. Por lo general, la industria utiliza manteca de cacao prensada, la cual solo es filtrada y desodorizada para obtener el sabor y aroma deseado. Este subproducto en condiciones adecuadas, tiene un período de vida útil de un mes aproximadamente. Si se

requiere almacenarla por largo tiempo se recomienda aplicar técnicas crioconservación para prevenir la oxidación (Beckett, 2009)

2.7.3 Polvo de Cacao

El polvo de cacao es el resultado del uso de diferentes técnicas en la molienda de la pasta de cacao. Para la producción de polvo de cacao con contenido graso menor al 10% se necesita un proceso de extracción usando CO₂ u otros solventes, mientras que la molienda criogénica de la pasta produce polvo de cacao con un contenido de grasa mayor al 30%. El proceso adecuado de temperado es indispensable en la elaboración de este subproducto, ya que un incorrecto temperado del polvo puede ocasionar cambios en el color y textura, causando la formación de grumos (Beckett, 2009).

2.8 Chocolate

Según Afoakwa, citado por Díaz *et al.* (2013), el chocolate es una suspensión semisólida conformada por partículas sólidas y finas de azúcar, pasta de cacao y leche, donde sus ingredientes principales y aditivos varían según el tipo de chocolate que se desea elaborar. Existen tres tipos principales de chocolate que son dark, de leche y blanco, que difieren por su contenido de licor de cacao, leche, grasa y manteca de cacao. Se mantiene sólidos a temperatura ambiente (20-27%) y se derriten a temperatura corporal (37%) durante su consumo según su contenido graso.

El chocolate contiene un 6% de proteína, 61% de carbohidratos y 3% de humedad, minerales (fósforo, calcio, hierro, magnesio) y vitaminas (A, complejo B) (Valenzuela, 2007). Este alimento contiene aproximadamente un 30% de materia grasa, porción que se descompone en ácidos grasos esteáricos (34%), palmíticos (27%) y oleicos (34%), así como ácidos grasos de cadena corta (5%), que benefician a la salud cardiovascular. Además, el chocolate se caracteriza por su contenido de antioxidantes como los polifenoles relacionados con la prevención de algunos tipos de cáncer, fibra

dietética que favorece el movimiento intestinal, aminoácidos como el triptófano y feniletilamina que favorecen la producción natural de serotoninas y anfetaminas, que por señales nerviosas producen una sensación de felicidad en las personas (San Martín, Aulla, & Pico, 2010; Valenzuela, 2007).

2.8.1 Elaboración de Chocolate

Según San Martín *et al.* (2010), la elaboración de chocolate comparten por lo general los procesos de mezclado, refinado, conchado, templado y moldaje; lo cual permite obtener un producto de textura delicada y deseable por los sentidos.

2.8.1.1 Mezclado

Es un proceso fundamental que consiste en homogenizar los ingredientes bajo condiciones apropiadas de temperatura y tiempo con movimientos continuos. Según el tipo de chocolate a elaborar, se bate el licor de cacao, azúcar, manteca de cacao, crema de leche y leche en polvo durante 12 -15 minutos a 40 – 50°C.

2.8.1.2 Refinado

Según Afoakwa, Díaz *et al.* (2013), el refinado permite obtener una textura suave en el chocolate. Las distintas mezclas del chocolate son presionadas usando refinadores de dos a cinco rodillos, hasta alcanzar un tamaño de partículas inferior a 30 μm . El tamaño final de las partículas influye en las propiedades reológicas y sensoriales del producto.

2.8.1.3 Conchado

Esta operación consiste en calentar la mezcla de chocolate a más de 50°C dentro de unas cubas o conchas, hasta adquirir una consistencia fluida, la cual debe ser removida durante muchas horas. Durante este proceso se produce una aireación del producto con lo cual se mejora su

aroma, se evapora la humedad y los ácidos volátiles, perdiendo el sabor amargo, y su vez se logra homogenizar su textura. El tiempo y temperatura de conchado depende del producto que se desea obtener: para chocolates con leche va de 10-16 horas a 49-52°C, con leche en polvo el tiempo es de 16 a 24 horas a más de 60°C y para chocolates dark a temperaturas entre 70-82°C (Agell, 2000; Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013).

2.8.1.4 Templado

El templado o enfriamiento implica una pre-cristalización de la porción grasa del chocolate. Durante las operaciones anteriores, el chocolate se mantiene a temperatura constante de 45 - 55°C, por lo que se procede a aplicar diferentes temperaturas para lograr la cristalización estable de la manteca de cacao. El templado consta de 4 pasos claves que son: derretimiento a 50°C, enfriamiento al punto de cristalización a 32°C, cristalización a 27°C y conversión de algún cristal inestable a 29 - 32°C. Este proceso le aporta brillo y untuosidad al chocolate, y permite una buena conservación del mismo (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013; Figueroa, 2011).

2.8.1.5 Moldaje

Por lo general el chocolate se moldea en tabletas, de forma manual o mecánica. Esto se realiza manteniendo al chocolate a una temperatura de 28-30°C, luego se deja enfriar al ambiente durante 15 minutos para ser colocado en refrigeración a 4°C durante 24 horas. Es importante eliminar las burbujas de aire que pudieran haberse formado, por lo que los moldes deben ser agitados adecuadamente. Una vez que el chocolate se haya enfriado uniformemente, este se contrae y al darle la vuelta se desprende del molde con facilidad (Agell, 2000; Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013; Figueroa, 2011).

2.9 Edulcorantes

Según Aguilar, citado por Cerón (2016), la palabra “edulcorante” proviene del vocablo latín *dulcor* que significa dulzor. Es así, que los edulcorantes son aquellas sustancias capaces de endulzar un alimento, una bebida o medicamento.

Entre las principales aplicaciones y funciones de los edulcorantes en la industria alimentaria se encuentran (Valdés & Ruiz, 2009).

- Aporte de sabor dulce a un producto.
- Neutralizador de sabores astringentes y/o picantes.
- Dada su higroscopicidad tiene el efecto preservativo sobre los productos porque reduce el crecimiento microbiano.
- Fuente de carbono para levaduras y otros microorganismos en procesos fermentativos de ciertos alimentos (panificación, alcoholes, vinagre, entre otros)
- Contribuyen en el desarrollo de color y sabor en ciertos alimentos de panificación dada sus reacciones de caramelización y oscurecimiento de Maillard.
- Proveen cuerpo, textura y palatabilidad en jarabes, helados, mermeladas, etc.
- En mezclas de edulcorantes mejoran las propiedades funcionales como el punto de congelación y cristalización en helados y dulces.

Valdés & Ruiz (2009), clasifican a los edulcorantes de la siguiente manera:

- Por su origen: naturales y artificiales
- Por su estructura: hidratos de carbono, polioles (alcoholes del azúcar), glucósidos, proteínas y otros.
- Por su valor nutritivo: nutritivos y no nutritivos.
- Por su valor calórico: calóricos y no calóricos.

En el siguiente cuadro se muestra algunos de los edulcorantes más utilizados, así como su poder edulcorante y sus distintas formas de obtención:

Tabla 3
Edulcorantes alternativos a la sacarosa

| Producto | Poder edulcorante | Forma de obtención |
|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>Edulcorantes calóricos</i> | | |
| Sacarosa | 1 | E, F |
| Fructosa | 1.4 | E, F |
| Azúcar invertido | 1.3 | Q, E |
| Jarabes fructosados (55%) | 1 | E |
| Jarabes maltosados (45-60%) | 0.4 | E |
| Maltosa | 0.5 | E |
| Lactosa | 0.27 | E |
| Sorbitol | 0.5-0.6 | Q |
| Manitol | 0.6-0.8 | Q |
| Xilitol | 1 | Q, E |
| Eritritol | 0.7-0.8 | F |
| Lactitol | 0.4 | Q |
| Tagatosa | 0.92 | E |
| <i>Edulcorantes no calóricos</i> | | |
| Aspartamo | 100-200 | QFE, FE |
| Alitamo | 2000 | QE, E |
| L-azúcares | 1 | Q |
| Sacarina | 300 | Q |
| Ciclamatos | 30 | Q |
| Sucralosa | 600 | QE |
| Taumatina | 3000 | N, F |
| Monelina | 2500 | N |
| Estevióside | 300 | N |

| | | |
|----------|------|------|
| Dulcina | 200 | Q |
| Monatina | 1400 | E, F |

N=natural, Q=sintético químico, E=enzimático, F=fermentativo

Fuente: (López & Canales, 2004; Sánchez Gómez, 2014)

2.9.1 Sacarosa

La sacarosa, es sin lugar a dudas el edulcorante de mayor consumo mundial, la misma que proviene de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) o de la remolacha azucarera (*Beta vulgaris var. Altissima*) y cuya producción global alcanza de 95 a 100 millones de toneladas al año; su consumo per cápita anual excede los 40 kg en el mundo occidental (López & Canales, 2004).

Este azúcar se trata de un disacárido, integrado por dos monosacáridos que son la glucosa y la fructosa. Su fórmula es: $C_{12}H_{22}O_{11}$ (Oxígeno 51.42%, Carbono 42.10% e Hidrógeno 6.48%), peso molecular: 342.30 (Sánchez Gómez, 2014).

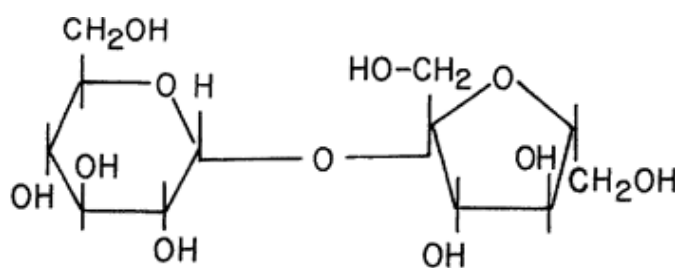


Figura 1 Estructura química de la sacarosa
Fuente: (López & Canales, 2004)

2.9.1.1 Propiedades

Es edulcorante natural por excelencia, compuesto por 50% de fructosa y 50% de glucosa. Tiene funciones estructurales y de imagen, según el alimento en el que se use, otorgando viscosidad al medio, volumen y textura,

así como reacciones de caramelización que genera colores deseados en ciertos productos (Cubero, Monteferrer, & Villalta, 2002).

La sacarosa tiene un alto grado de solubilidad (211.4g/100 ml de agua a 25°), una gran capacidad de hidratación (6.6 ±0.7 Moles H₂O/mol azúcar), menor higroscopía que la fructosa, y su punto de fusión es a los 186°C. Posee un grado de viscosidad intermedia entre los jarabes de alta fructosa y los de glucosa con alto contenido de almidones no hidrolizados (Sánchez Gómez, 2014).

2.9.1.2 Uso

Se utiliza en cualquier producto alimenticio procesado como bebidas, postres, helados, confites y panadería, así como en alimentos elaborados en el hogar. Es una fuente importante de energía en la dieta humana. Desde el punto nutricional, el problema del azúcar es que, al tratarse de una sustancia químicamente pura, no aporta de otros nutrientes indispensables como proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales (Sánchez Gómez, 2014).

2.9.1.3 Toxicología

Es bien conocida la relación directa existente entre el consumo de azúcares, (especialmente sacarosa) y la caries dental; enfermedad que consiste en el crecimiento de bacterias tales como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*, que utilizan la sacarosa y lo transforman en ácido pirúvico, acético y láctico, responsables de disolver el esmalte de los dientes. Bajo la presencia de sacarosa, estos microorganismos sintetizan dextranas (polímeros de glucosa) que les sirven de soporte y crean un ambiente propicio para su crecimiento. Por otra parte, este disacárido es asimilado fácilmente por el intestino, transformándolo en los correspondientes monosacáridos; donde la glucosa es absorbida con rapidez incrementando de manera violenta su concentración en la sangre, siendo no apto para personas diabéticas (Badui, 2006).

Según el Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación - EUFIC, la sacarosa produce sobrepeso u obesidad si se consume fuera de las porciones requeridas por el cuerpo, es decir, si la energía consumida supera la energía quemada en un determinado período de tiempo. En un estudio publicado por la revista *American Journal of Clinical Nutrition*, se demostró que personas que consumieron sacarosa aumentaban su ingestión de energía, peso corporal, masa de grasa y presión sanguínea, a diferencia de las que consumieron otros edulcorantes de naturaleza no calórica (EUROPAPRESS, 2002).

2.9.1.4 Caries dental

Existe una relación estrecha entre el desarrollo de la caries dental y el consumo de alimentos con la fase principal del metabolismo de los microorganismos. Según Negroni *et al.* (2009), la formación de la placa bacteriana se relaciona directamente con la presencia de azúcares, los cuales coadyuvan en la disminución del pH de cavidad oral, principio básico para el proceso de desmineralización del esmalte.

Dentro de la población microbiana oral se puede encontrar el desarrollo de formas cocáceas predominantes en la placa temprana, con presencia de bacilos y formas filamentosas. Sin embargo, microorganismos del género *Streptococcus* constituyen el mayor número del total de la población bacteriana en la placa dental, dentro de los cuales se identifican a las siguientes especies: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, y *S. milleri* (Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013).

Las especies más importantes que afectan a la salud dental del ser humano son *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Los cuales se caracterizan por ser colonizadores secundarios del biofilm que rodea a los dientes y su patogenicidad se ha demostrado por la producción de caries del esmalte, debido a la capacidad que poseen de producir ácidos a partir de la sacarosa que lo desmineralizan (Linossier & Valenzuela, 2011).

Streptococcus mutans

Según Marsh, citado por Liébana (2002), las características distintivas más importantes grupo mutans son: a) capacidad dominante de transportar azúcares; b) rápida capacidad de convertir estos azúcares en ácidos y c) capacidad de mantener estas funciones en condiciones en pH bajo (4.5-5.5).

Estas bacterias cocos gram-positivos, son fermentadores de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina para producir ácidos. Son anaeróbicas facultativas, es decir, pueden desarrollarse en presencia de oxígeno, sin embargo, su crecimiento óptimo ocurre en ausencia del mismo (medio anaeróbico) (Sánchez & Acosta, 2007).

Su cariogenicidad radica en la capacidad de generar enzimas denominadas fructosiltransferasas (FTF) y glucosiltransferasas (GTF); las cuales permiten la hidrólisis de la sacarosa de la dieta, conectando las porciones de glucosa entre sí formando uniones glucosídicas para constituir glucanos insolubles; facilitando a los microorganismos adherirse a las superficies lisas de los dientes y formar la placa dental o biofilm. La fijación específica e inespecífica de *S. mutans* y otros microorganismos a los glucanos, así como la formación de ácidos, contribuyen a la desmineralización del esmalte de los dientes y con ello el inicio del proceso cariogénico (Plazas, 2015).

2.9.2 Edulcorantes No Calóricos

Según Navarro, citado por Sánchez Gómez (2014), el abuso de consumo de hidratos de carbono, especialmente de sus refinados, ha sido una de las principales causas de padecimientos de hipernutrición como la obesidad, diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares, y otras de similar importancia como la caries dental. Estas han sido las principales razones que han motivado a los investigadores de distintas áreas relacionadas, a desarrollar nuevas sustancias con la capacidad de conferir sabor dulce a los

alimentos, con mínimo aporte calórico para ser empleados con fines dietéticos

Los edulcorantes no calóricos son aquellos aditivos alimentarios que poseen la capacidad de imitar el efecto del azúcar pero a su vez aporta una menor o nula cantidad de calorías (García Almeida, Casado, & García Alemán, 2013). Este grupo contiene productos de origen natural y sintético, con un aporte menor al 2% del valor calórico de la sacarosa; ninguna de estas sustancias proporciona energía para el desarrollo de bacterias de la placa dental por lo que son consideradas no cariogénicas (Cubero, Monteferrer, & Villalta, 2002). Su bajo valor calórico y el poder edulcorante que poseen los convierten en excelentes sustitutos de la sacarosa (Cerón, 2016).

2.9.2.1 Eritritol

El eritritol es un azúcar alcohol (poliol) natural presente en ciertas frutas y productos derivados de la fermentación del vino, soya y queso. Su fórmula molecular es $C_4H_{10}O_4$ y su peso molecular es de 122.12 g/mol. Es el primer poliol manufacturado industrialmente, donde la glucosa pasa un proceso de fermentación por *Aureobasidium sp.*, hasta generar eritritol (Bordoni, Escobar, & Mercado, 2010; Cubero, Monteferrer, & Villalta, 2002).

El eritritol administrado por vía oral en los seres humanos, al ser una pequeña molécula de 4 carbonos (figura 2), es absorbido rápidamente por el intestino delgado, por lo que no es metabolizado por el cuerpo y por lo tanto es excretado por la orina (Rodríguez, 2014).

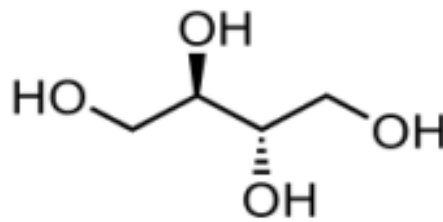


Figura 2 Fórmula química del eritritol

Fuente: (Rodríguez, 2014)

Propiedades

El eritritol posee un poder edulcorante del 70 a 80% con respecto al de la sacarosa y es considerado no calórico por su bajo contenido energético de 0.2 kcal/g. Presenta buena estabilidad físico-química, ya que no reacciona con otros ingredientes activos, resiste al almacenamiento y permanece intacto a cambios extremos de temperatura (160°C), es estable en rangos de pH de 2-10.2 y desarrolla sinergismo con endulzantes de alta potencia. No altera los niveles de glucosa o insulina por lo que es un apropiado sustituto para diabéticos (Bordoni, Escobar, & Mercado, 2010).

Uso

Debido a su semejanza a la sacarosa en sabor, apariencia y cristalinidad, el eritritol es usado también en edulcorantes de mesa, pero sin añadir calorías. Es empleado en goma de mascar dejando un efecto de enfriamiento; en helados mejora la textura; y en chocolates con 30% menos calorías, así como en productos dentales y farmacéuticos (Bordoni, Escobar, & Mercado, 2010).

Se ha demostrado la no acidogenicidad de los polioles como el eritritol, ya que no alteran el pH de la placa, creando un ambiente no apto para la formación bacterias que desmineralizan la dentina, por lo cual se le atribuye de muy baja a ninguna capacidad cariogénica. Recientes investigaciones

han comprobado que el uso de eritritol como edulcorante en confites y otros productos orales, tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de bacterias cariogénicas, principalmente el *Streptococcus mutans*, así como la disminución de la adherencia de las bacterias orales comunes a la superficie de los dientes y la disminución de la formación de biopelículas y peso bacteriano in vivo (de Cock *et al.*, 2016; Runnel *et al.*, 2013). Por lo que este poliol, también ha sido utilizado en farmacología en chicles medicados y productos de higiene bucal como: pastas dentales, enjuagues bucales, entre otros (Bordoni, Escobar, & Mercado, 2010).

Adicionalmente, se ha demostrado que el eritritol es un excelente poliol eliminador de radicales, por lo que tiene usos a fines como antioxidante in vivo, ya que brinda protección frente al daño vascular inducido por la hiperglucemia (Sánchez Gómez, 2014).

Toxicología

Varios estudios de seguridad han demostrado que el eritritol es bien tolerado en el organismo humano sin provocar efectos toxicológicos. En los Estados Unidos, la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha otorgado la denominación de consumo diario “no especificado”, a través del comité de expertos en aditivos alimenticios de la organización de alimentos y agricultura (Bordoni, Escobar, & Mercado, 2010).

2.9.2.2 Stevia

La *Stevia rebaudiana* también llamada hierba dulce del Paraguay, es una planta herbácea perenne de la familia de las asteráceas originaria de la región tropical de Sudamérica, la cual desde hace varias décadas ha sido cultivada por sus propiedades edulcorantes totalmente naturales y de bajísimo contenido calórico (González, 2011).

Los compuestos edulcorantes están contenidos principalmente en sus hojas. En 1931 los químicos franceses M. Bridel y R. Lavielle lograron el

aislamiento de los glúcidos que generan su sabor, a los cuales denominaron *esteviósidos* y *rebaudiósidos*. Estos glúcidos son diterpenos no tóxicos y no mutagénicos, con un poder edulcorante hasta 300 más concentrado que el azúcar, los cuales son usados comercialmente por su bajo contenido calórico y resultan aptos para diabéticos y útiles en dietas hipocalóricas, ya que no alteran los niveles de glucosa en la sangre (González, 2011).

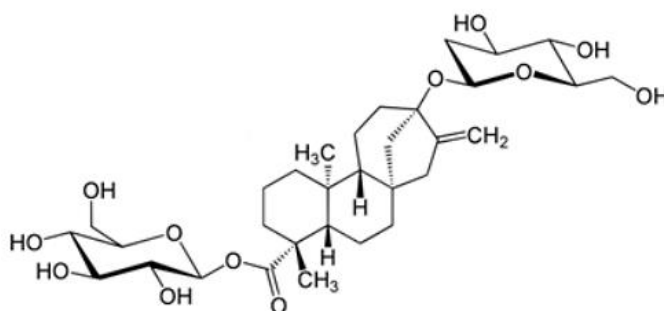


Figura 3 Estructura molecular del esteviósido

Fuente: (Martínez T. , 2002)

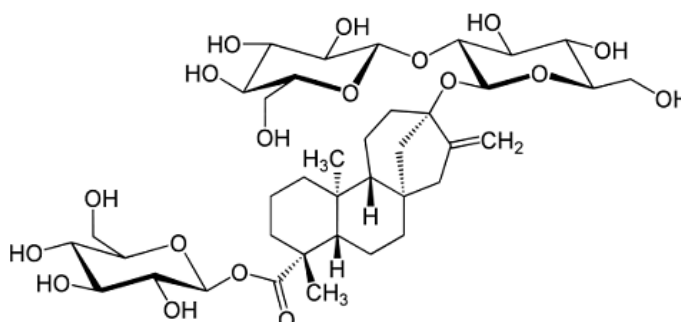


Figura 4 Estructura molecular del rebaudiósido

Fuente: (Martínez T. , 2002)

Propiedades

La stevia es de 25 a 30 veces más dulce que la sacarosa y su extracto unas 300 veces más dulce. Es carente de nutrientes, no calórico, es estable a los 200°C, no se fermenta, no genera placa dental, no es cariogénico, ni se cristaliza como el azúcar. Este glucósido es considerado como dietético porque su estructura no se metaboliza en el organismo humano y es

considerado totalmente apto para pacientes que padece diabetes, ya que no afectan la concentración de glucosa a nivel sanguíneo. Los análisis proximales de la planta han comprobado el contenido de ácido fólico, vitamina C y todos los aminoácidos esenciales excluyendo al triptófano (González, 2011; Sánchez Gómez, 2014).

Uso

El 70% de la producción mundial de *Stevia rebaudiana* es utilizada para procesar cristales de esteviósido, mientras que el 30% restante es destinado para usos herbarios. Este edulcorante natural se utiliza en cientos de productos como bebidas (incluida la Coca-Cola) y todo tipo de alimentos. No produce efectos secundarios, no genera reacciones alérgicas ni presenta descomposición (Sánchez Gómez, 2014).

Toxicología

En 1991, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) presentó un controvertido fallo sobre la stevia, prohibiendo su consumo sin aducir razones para ello. Para 1995, este fue revertido, pero solo se aprobó su comercialización a nivel de centros naturistas. Siendo esto una de los principales impedimentos para su uso a nivel industrial y a gran escala (González, 2011).

En junio de 2004, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), concluyó que la stevia es completamente inocua y se está evaluando la posibilidad de ingresarla al Códex alimentario Mundial. En 2008 la FDA concedió la certificación Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS) al rebaudiósido como edulcorante genérico para alimentos y bebidas, y posteriormente a otros glúcidos de esteviol (González, 2011).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales, reactivos y equipos

3.1.1 Utensilios y equipos para la elaboración de chocolate

Utensilios

- Tabla de mármol
- Espátulas de acero inoxidable
- Espátulas de silicona
- Moldes plásticos
- Tazones de vidrio
- Tazones metálicos
- Termómetro digital para alimentos

Equipos

- Molino de disco
- Cocina

3.1.2 Materiales, equipos y reactivos de laboratorio para el análisis microbiológico

Materiales

- Botellas Pyrex de 100ml
- Pipetas
- Asas microbiológicas
- Tijeras
- Guantes
- Mascarilla
- Alcohol
- Agua destilada
- Hisopos

- Puntas descartables (100)
- Cajas Petri 60x15mm
- Cubetas
- Matraz 500ml
- Tubos de ensayo 10ml
- Agua destilada estéril
- Frascos plásticos estériles
- Solución salina
- Gradillas

Equipos

- Cámara de flujo LABCONCO Purifier
- Incubadora microbiológica BINDER
- Calefactor con agitador magnético
- Micropipetas automáticas (10-100 μ L)
- Autoclave Tutnauer 3870
- Jarra de Anaerobiosis de 2.5 L
- Mechero de Bunsen
- Balanza de precisión analítica Mettler PJ 4000-F
- Agitador Vortex Mixer
- Estereomicroscopio OLYMPUS SZ61
- Lupa para contaje PROCED

Reactivos

- Cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
- Agar Sangre
- Glicerol
- Agar Mitis Salivarius
- Sacarosa
- Telurito de potasio
- Bacitracina

- Eritritol
- Estevióside
- Caldo BHI (Infusión Cerebro - Corazón)

3.2 Preparación del Chocolate

3.2.1 Recolección de la Materia Prima

Se adquirió alrededor de 3 kg de semillas frescas de cacao fino de aroma; proveniente de la parroquia Unión Milagreña del cantón La Joya de Los Sachas, perteneciente a la provincia de Orellana, Ecuador.

3.2.2 Fermentación del Cacao

Se seleccionaron las almendras de cacao según su estado sanitario y posteriormente se colocaron en cajas de madera de 60 cm x 25 cm. Las cajas fueron cubiertas con hojas de plátano y se dejó reposar durante 48 horas, con remociones intermedias para procurar una fermentación uniforme, dejándolas por 48 horas más hasta completar el proceso (Torres, 2012)



Figura 5 Fermentación de cacao en cajas

3.2.3 Secado de las Semillas

Una vez finalizada la fermentación, las almendras fueron colocadas sobre un plástico negro en una superficie plana, recibiendo el calor directo del sol durante 3 días para que logren desprender toda la humedad posible.



Figura 6 Secado de semillas de cacao

3.2.4 Selección y Tratamiento de las Muestras

Se seleccionaron las semillas de color uniforme, completamente secas y libres de hongos. Los residuos de la pulpa y partículas extrañas, fueron retirados cuidadosamente. Se descartó a aquellas de tamaño pequeño, achatadas, vanas e impropias para el procesamiento (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013).



Figura 7 Semillas impropias vs. Semillas aptas para el procesamiento

3.2.5 Torrefacción y Decortización

El propósito de este proceso es desarrollar el aroma del cacao, así como disminuir los residuos de humedad y realizar la descontaminación microbiana de los granos. La torrefacción o tostado de las almendras se realizó durante 25 minutos a una temperatura de 100 a 150 °C. La corteza de los granos fue retirada manualmente a fin de tener las semillas desnudas (Agell, 2000).



Figura 8 Tostado y decortización de las almendras

3.2.6 Molienda

A través de un molino de disco, las almendras de cacao fueron trituradas reduciendo el tamaño de las partículas y modificando su textura. Durante la molienda al generarse calor por la fricción, se fundió la manteca del cacao (a los 32 °C), dando origen al licor de cacao; una masa suntuosa de color café oscuro, olor intenso y fuerte sabor, solidificable al disminuir su temperatura (Agell, 2000).



Figura 9 Molienda de almendras decortizadas de cacao

3.2.7 Mezclado

Durante esta etapa se efectuó la mezcla de los ingredientes a una temperatura constante de 45 a 55°C hasta formar una masa pastosa consistente (Figuerola, 2011). Con base a previos a ensayos de degustación realizados y porcentajes en peso más usados, las formulaciones a utilizar se detallan a continuación:

Tabla 4
Tratamientos de chocolate edulcorados con sacarosa, eritritol y stevia

| Tratamiento | Pasta de Cacao % | Manteca de Cacao % | Lecitina % | Eritritol % | Esteviósido % | Sacarosa % |
|-------------|------------------|--------------------|------------|-------------|---------------|------------|
| T0 | 61 | 7 | 2 | - | - | 30 |
| T1 | 70.5 | 7 | 2 | 20 | 0.5 | - |
| T2 | 60.7 | 7 | 2 | 30 | 0.3 | - |
| T3 | 50.9 | 7 | 2 | 40 | 0.1 | - |

* Los porcentajes de eritritol utilizados se encuentran dentro de los valores recomendados para su uso en alimentos según Bernt, Borzelleca, Flamm, and Munro (1996).

3.2.8 Templado

Posterior a la adición de los ingredientes, el chocolate fue mezclado de forma constante hasta homogenizar la masa por completo a una temperatura aproximada de 40 a 50°C, donde la manteca de cacao se encuentra superior al punto de fusión siendo esta maleable. Según recomienda (Figueroa, 2011), el chocolate se dejó enfriar a 28 °C sobre una placa de granito, a fin de que los cristales de la manteca alcancen estabilidad formando una masa de chocolate fina y homogénea con brillo y untuosidad. Posteriormente se volvió a calentar hasta alcanzar los 32°C de temperatura, para ser colocados en los respectivos moldes. Este proceso se considera un punto crítico de control, ya que facilita el moldaje y asegura una buena conservación del chocolate.



Figura 10 Templado del chocolate

3.2.9 Enfriamiento y Moldaje

El chocolate en estado semi-sólido fue dosificado en los moldes plásticos (12cm x 4cm), cuya temperatura rodeaba entre los 28 y 30°C. Se dejó enfriar durante 15 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se colocó en refrigeración a 4°C durante 24 horas (Díaz, Pinoargote, & Castillo, 2013).

3.3 Prueba de degustación

3.3.1 Tamaño de la muestra experimental

Las pruebas de evaluación sensorial se realizaron en la Carrera de Ingeniería Agropecuaria – IASA I, a estudiantes de 6to, 7mo y 8vo nivel; quienes en este estudio fueron considerados en la categoría de panelistas consumidores. La muestra se obtuvo de acuerdo a la siguiente ecuación:

Ecuación 1

Tamaño de la muestra

$$n = \frac{k^2 * p * q * N}{(e^2 * (N - 1)) + k^2 * p * q}$$

En donde,

N= Tamaño de la población

n= Tamaño de la muestra

k= Constante nivel de confianza (1,96 para 95%)

p=0.5

q= 0.5

e= porcentaje de error (0.05)

El tamaño de la población de estudiantes es 75, por lo tanto, la muestra será la siguiente:

$$n = \frac{1,96^2 * 0.5 * 0.5 * 75}{(0.05^2 * (75 - 1)) + 1,96^2 * 0.5 * 0.5}$$

$$n = 65$$

3.3.2 Preparación de las muestras de chocolate

Las muestras evaluadas fueron porciones de chocolate rectangulares de 5 g endulzadas con sacarosa y eritritol + stevia, las cuales fueron codificadas de la siguiente manera:

204: Chocolate endulzado con 30% de sacarosa

427: Chocolate endulzado con 20% de eritritol + 0.5% de stevia

149: Chocolate endulzado con 30% de eritritol + 0.3% de stevia

255: Chocolate endulzado con 40% de eritritol + 0.1% de stevia

Previa a la prueba de degustación, los panelistas recibieron indicaciones sobre el análisis sensorial y el tiempo que deben mantener el chocolate en su boca, así como masticar entre tratamientos los trozos de manzana entregados para evitar la mezcla de sabores.

3.3.3 Aplicación de la prueba de degustación

Se aplicó un tipo prueba afectiva conocida como prueba de grado de satisfacción, lo que permitió conocer la preferencia del panelista hacia un producto alimenticio y por consiguiente su gusto o disgusto frente al producto catado (Hernández, 2005).

En dicha prueba se utilizó la escala hedónica verbal de 5 puntos con los siguientes valores:

Tabla 5
Niveles de la escala hedónica

| Descripción | Valor |
|----------------------------|-------|
| Me gusta mucho | 5 |
| Me gusta moderadamente | 4 |
| Ni me gusta ni me disgusta | 3 |
| Me disgusta moderadamente | 2 |
| Me disgusta mucho | 1 |

Fuente: (Hernández, 2005)

Esta escala se aplicó para evaluar los principales atributos sensoriales de los chocolates preparados, los cuales fueron: color, aroma, textura, sabor y dulzor. A partir de dichos atributos se realizó un promedio con el fin de

obtener la aceptabilidad general de cada tratamiento para su respectivo análisis.



Figura 11 Aplicación de la prueba de degustación a estudiantes de la Carrera de Ingeniería Agropecuaria- IASA I

3.4 Análisis microbiológico

3.4.1 Preparación de los medios de cultivo

3.4.1.1 Agar sangre

En un matraz se colocaron 12 g de medio agar sangre base con 300 ml de agua destilada, se mezcló hasta diluir por completo el medio y se llevó a ebullición a 90°C durante 1 minuto. Posteriormente se procedió al autoclavado del medio de cultivo a 121°C – 1.1 atm por 15 minutos, se dejó enfriar y se trasladó a una cámara de flujo laminar para adicionar 3% de sangre de cordero a una temperatura de 45°C. Una vez lograda una mezcla homogénea, se dispensó el medio en cajas Petri las cuales fueron llevadas a refrigeración a 4°C para su uso posterior (Pedraza & Hernández, 2006).

3.4.1.2 Agar MSA enriquecido (Bacitracina-Telurito-Sacarosa)

Se partió pesando 45 g de medio y 100 g de sacarosa (20%), los cuales se disolvieron en 500 ml de agua destilada, la mezcla homogenizada se llevó a ebullición a 90°C por 1 minuto. El medio de cultivo fue autoclavado durante 15 minutos a 121°C y 1.1 atm., se dejó enfriar y se adicionó 500 µL de

bacitracina (0.2 u/ml) y 500 µL de telurito de potasio al 1%. A continuación, dentro de una cámara de flujo laminar, se dispensó el medio en cajas Petri, se dejaron enfriar y se llevaron a refrigeración a 4°C (Orellana, 2016).

3.4.1.3 Infusión cerebro – corazón (BHI)

En 300 ml de agua destilada se diluyó 11.1 g de caldo BHI, la mezcla homogenizada se llevó a ebullición a 90°C por un 1 minuto. A continuación, se dispensaron en tubos de ensayo 5ml del caldo, los cuales se esterizaron a 121°C – 1.1 atm por 15 minutos. Una vez cumplido el tiempo de enfriamiento, los tubos fueron conservados en refrigeración a 4°C (Orellana, 2016).

3.4.2 Recuperación de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175

Se utilizó una cepa pura de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), obtenida del cepario del Departamento de Microbiología del “Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública Leopoldo Izquieta Pérez”, la cual se mantuvo previamente refrigerada y conservada en glicerol + BHI a -180° C. Para su activación se procedió a inocular la bacteria en agar sangre y se incubó a 35±2°C en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas (Sucuzhañay, 2015).

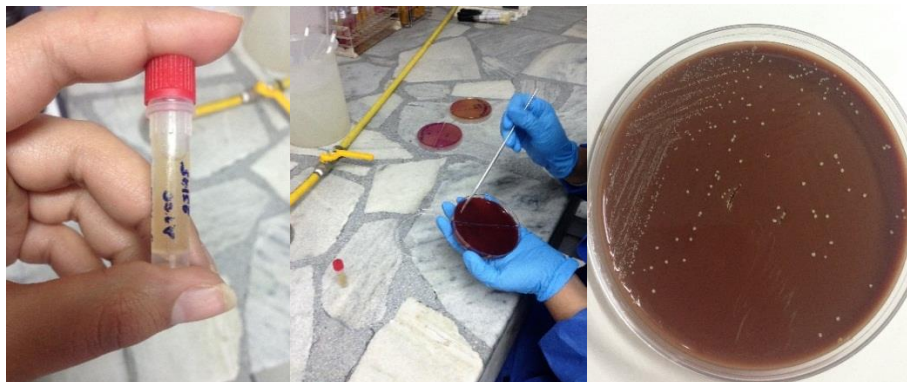


Figura 12 Siembra y recuperación de *S. mutans* ATCC 25175

3.4.3 Preparación de una suspensión de *Streptococcus mutans* 0.5 Mc. Farland.

Una vez recuperadas las colonias, se preparó una suspensión en la escala de turbidez 0.5 Mc. Farland (1.5×10^8 UFC/ml) en solución salina, con ayuda de un turbidímetro previamente calibrado.

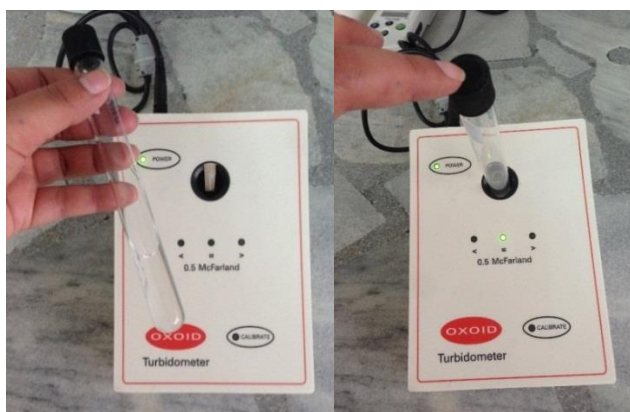


Figura 13 Preparación de la suspensión bacteriana de *S. mutans*

3.4.4 Almacenamiento y descontaminación de las muestras

Para el análisis microbiológico se tomaron 20 g de cada formulación de chocolate y se envasaron en frascos plásticos estériles. Posteriormente al proceso de enfriamiento, todos los tratamientos se colocaron en una cámara de flujo y se sometieron a esterilización ultravioleta de onda corta (540nm) durante 10 minutos, a fin de eliminar la carga microbiana presente en las muestras.



Figura 14 Esterilización UV de las muestras en cámara de flujo laminar

3.4.5 Preparación de las diluciones

Seguido del proceso de esterilización, se pesó 1g de cada tratamiento y se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril para obtener una solución al 10% en cada caso. Las diluciones se sometieron a baño maría para disolver el chocolate y lograr una adecuada homogenización.

3.4.6 Macrodilución en caldo

En los tubos con caldo BHI se adicionó 100 μ L de la dilución al 10% de cada chocolate + 100 μ L de la suspensión bacteriana (0.5 Mc Farland), como se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 6
Componentes de las macrodiluciones

| Tubo | BHI | Suspensión <i>S. mutans</i> (0.5 Mc Farland) | Dilución de chocolate al 10% |
|------|-----|---|---------------------------------|
| 1 | 5ml | 100 μ L | 100 μ L fórmula T0 |
| 2 | 5ml | 100 μ L | 100 μ L fórmula T1 |
| 3 | 5ml | 100 μ L | 100 μ L fórmula T2 |
| 4 | 5ml | 100 μ L | 100 μ L fórmula T3 |

Las diluciones preparadas fueron homogenizadas y colocadas en la incubadora a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

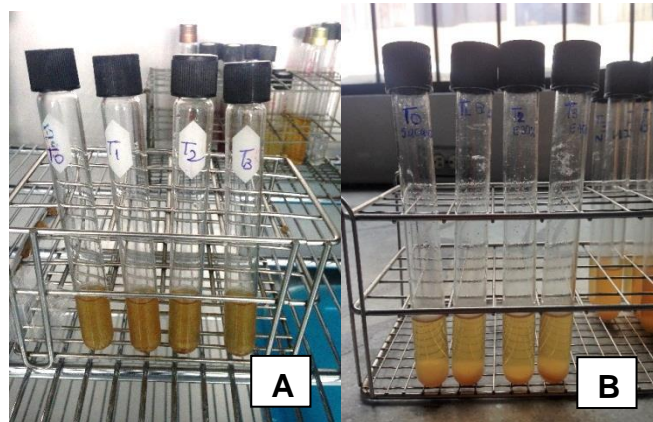


Figura 15 A) Macrodiluciones iniciales B) Macrodiluciones después de 24 horas de incubación

3.4.7 Siembra de las macrodiluciones en Agar MSA enriquecido (B-T-S)

Tras las 24 horas de incubación, las macrodiluciones fueron diluidas 1:10 por duplicado en agua destilada estéril de forma seriada, hasta llegar al factor de dilución 10^{-8} . De la última serie se tomaron $100\ \mu\text{L}$ y se inoculó por estriado cuantitativo en Agar MSA enriquecido. Seguidamente, las cajas inoculadas se colocaron en la incubadora, en condiciones de anaerobiosis a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas para su posterior recuento.



Figura 16 Inoculación de las macrodiluciones en MSA

3.4.8 Recuento en placa

La identificación de las colonias de *Streptococcus mutans* se realizó por observación directa a través del estereomicroscopio, encontrándose por su morfología típica colonias adherentes, convexas, azules, con superficie rugosa y apariencia de vidrio esmerilado (Linossier, Carvaja, Donoso, & Orrego, 1999).



Figura 17 Identificación de las colonias en el estereomicroscopio

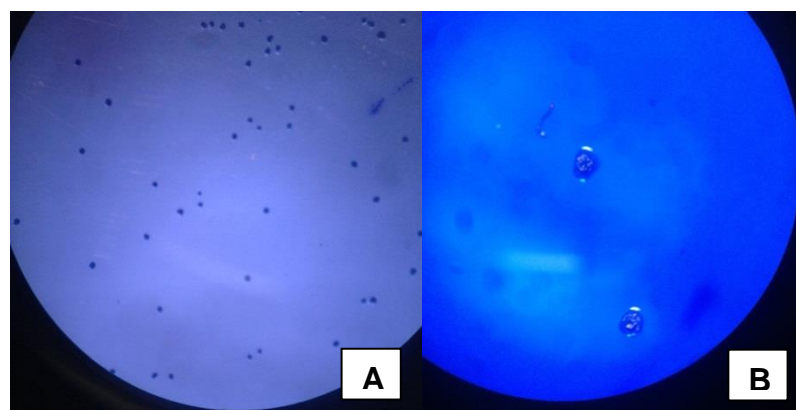


Figura 18 Colonias *S. mutans* en estereomicroscopio a un aumento de 0,67x (A) y 2,00x (B)

Una vez reconocidas las colonias se procedió a su contabilización utilizando una lupa PROCED con 10x de aumento. Para obtener el número real de unidades formadoras de colonias en 1 ml de caldo de la macrodilución (UFC/ml), se multiplicó el número de colonias encontradas por la inversa del factor de dilución y por 10 (Linossier, Carvaja, Donoso, & Orrego, 1999), de la siguiente manera:

Ecuación 2

Unidades Formadoras de Colonias por ml

$$\text{UFC/ml} = (\text{C} * \text{D})/\text{V}$$

En donde,

C: colonias

D: factor inverso de la dilución (10^8)

V: volumen de siembra (0.1 ml)

3.5 Análisis económico

El análisis de los costos de elaboración de las diferentes fórmulas, se realizó mediante una tabla de los precios comerciales de la materia prima, edulcorantes, aditivos alimenticios y costos de mano de obra por hora de trabajo. Para los costos de uso de equipos se dividió el costo total de los equipos depreciados a uno año para 8 horas diarias de uso, obteniendo el precio por hora.

Estos valores se dividieron para 1 barra de chocolate de 50 g en cada caso y se compararon entre sí. Del mismo modo se contrastaron los costos unitarios de las formulaciones estudiadas con los precios de venta de otros productos comerciales de composición similar.

3.6 Protocolo de elaboración

Se describió el proceso de elaboración de forma textual y gráfica (diagrama de flujo) del mejor tratamiento, basándose en el grado de aceptabilidad mostrado por parte de los consumidores y la capacidad inhibitoria del crecimiento de *S. mutans*.

3.7 Diseño experimental

3.7.1 Pruebas de degustación

Las pruebas de degustación se realizaron bajo un Diseño de Bloques Completamente Aleatorizados (DBCA), donde, las formulaciones de chocolate conformaron los tratamientos y los catadores constituyeron los bloques. Cada tratamiento contó con un total de 65 repeticiones equivalentes al número de degustadores. La unidad experimental fue una muestra de chocolate de 5 g endulzado con las dosis conocidas de los edulcorantes.

Los tratamientos evaluados en el análisis sensorial fueron los siguientes:

Tabla 7
Tratamientos evaluados

| Tratamiento | Composición |
|-------------|---|
| T0: | Pasta de cacao 61% + sacarosa 30% + manteca de cacao 7% + lecitina 2% |
| T1: | Pasta de cacao 70.5% + eritritol 20% + esteviósido 0.5% + manteca de cacao 7% + lecitina 2% |
| T2: | Pasta de cacao 60.7% + eritritol 30% + esteviósido 0.3% + manteca de cacao 7% + lecitina 2% |
| T3: | Pasta de cacao 59.1% + eritritol 40% + esteviósido 0.1% + manteca de cacao 7% + lecitina 2% |

3.7.2 Análisis microbiológico

La microbiología del proyecto se desarrolló bajo un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA). Cada tratamiento tuvo un total de 5 repeticiones, que corresponden al número de placas Petri inoculadas.

La unidad experimental consistió en una caja Petri con medio MSA enriquecido, en el cual se inoculó 100µL de las macrodiluciones de cada tratamiento, como se explica en la siguiente tabla:

Tabla 8
Macrodiluciones de los tratamientos a evaluar

| Nomenclatura | Descripción |
|--------------|---|
| T0: | BHI + suspensión 0.5 Mc Farland de <i>S. mutans</i> + dilución al 10% de chocolate edulcorado con 30% de sacarosa |
| T1: | BHI + suspensión 0.5 Mc Farland de <i>S. mutans</i> + dilución al 10% de chocolate edulcorado con 20% de eritritol + 0.5% esteviósido |
| T2: | BHI + suspensión 0.5 Mc Farland de <i>S. mutans</i> + dilución al 10% de chocolate con 30% de eritritol + 0.3 % esteviósido |
| T3: | BHI + suspensión 0.5 Mc Farland de <i>S. mutans</i> + dilución al 10% de chocolate con 40 % de eritritol + 0.1 % esteviósido |

3.8 Análisis estadístico

Los resultados alcanzados en las pruebas de degustación y la fase microbiológica de este estudio, se analizaron a través de tests de normalidad, análisis de varianza y comparación de medias utilizando el paquete estadístico IBM SPSS versión 22.0, como se describe a continuación:

3.8.1 Pruebas de degustación

Contando con datos que se ajustan a parámetros normales, comprobados a través del método de Levene y Shapiro-Wilk, se realizó un Análisis de la Varianza para un Diseño en Bloques Completamente Aleatorizado (DBCA), utilizando el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \beta_i + T_j + \varepsilon_{ij}$$

Siendo,

Y_{ij} = Grado de aceptabilidad

μ = Media general

β_I = Efecto de i-ésimo panelista

T_j = Efecto de la j-ésima fórmula de chocolate

ε_{IJ} = Error experimental

Tabla 9
Análisis de la varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|------------------------------------|--------------------|
| Total | 259 |
| Panelista (Bloque) | 64 |
| Tratamiento (Fórmula de chocolate) | 3 |
| Error | 192 |

Para la comparación de medias se usó una prueba de Tukey a un nivel de confianza 0.05, con lo cual se determinó las diferencias estadísticas existentes entre los tratamientos.

3.8.2 Análisis microbiológico

Se comprobó la normalidad de los datos del recuento en placa, a través de la prueba de Shapiro-Wilk y el método gráfico Q-Q plot, posterior a esto se realizó un Análisis de la Varianza (ANAVA) para un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), donde el modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Siendo,

Y_{ij} = Unidades Formadoras de Colonias por ml

μ = Media general

T_j = Efecto de la i-ésima fórmula de chocolate

ε_{IJ} = Error experimental

Tabla 10
Análisis de la varianza

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|------------------------------------|---------------------------|
| Total | 19 |
| Tratamiento (fórmula de chocolate) | 3 |
| Error | 16 |

Finalmente se realizó la comparación de las medias obtenidas por medio de la prueba de Tukey a un nivel de confianza de 0.05, con el fin de determinar las diferencias estadísticas presentes entre los tratamientos.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Pruebas de degustación

A partir de las pruebas sensoriales de las formulaciones de chocolate, se obtuvieron los siguientes resultados para los parámetros de aroma, textura, sabor, color y dulzor.

Tabla 11
Promedio \pm error estándar de la
aceptabilidad del aroma de chocolate
edulcorado con eritritol y stevia

| Tratamiento | Aroma | |
|----------------|-----------------|----|
| T0 | 4.06 \pm 0.11 | A |
| T1 | 3.83 \pm 0.10 | AB |
| T2 | 3.69 \pm 0.10 | B |
| T3 | 3.86 \pm 0.11 | AB |
| P valor | 0.0640 | |
| F valor (3.25) | 2.46 | |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla 12
Promedio \pm error estándar de la aceptabilidad de la textura de chocolate edulcorado con eritritol y stevia

| Tratamiento | Textura | |
|----------------|-----------------|---|
| T0 | 3.42 \pm 0.12 | A |
| T1 | 3.78 \pm 0.11 | A |
| T2 | 3.55 \pm 0.12 | A |
| T3 | 3.74 \pm 0.12 | A |
| p-valor | 0.0656 | |
| F-valor (3.25) | 2.44 | |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Tabla 13
Promedio \pm error estándar de la aceptabilidad del sabor de chocolate edulcorado con eritritol y stevia

| Tratamiento | Sabor | |
|----------------|-----------------|----|
| T0 | 3.49 \pm 0.12 | AB |
| T1 | 3.20 \pm 0.14 | B |
| T2 | 3.57 \pm 0.11 | A |
| T3 | 3.42 \pm 0.13 | AB |
| p-valor | 0.0569 | |
| F-valor (3.25) | 2.55 | |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Al analizar cada una de las variables no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en los casos de aroma, textura y sabor (Ver tabla 11, 12 y 13). Encontrándose diferencias solo en las variables de color y dulzor.

Tabla 14
Promedio \pm error estándar de la
aceptabilidad del color de chocolate
edulcorado con eritritol y stevia

| Tratamiento | Color | |
|----------------|-----------------|----|
| T0 | 4.18 \pm 0.09 | AB |
| T1 | 4.46 \pm 0.09 | A |
| T2 | 3.72 \pm 0.13 | C |
| T3 | 4.06 \pm 0.11 | BC |
| P valor | <0.001 | |
| F valor (3.25) | 8.265 | |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Al aplicarse la prueba ANAVA se encontraron diferencias estadísticas significativas (F (3,256) 8,265 $p < 0,001$) entre los promedios de los tratamientos. El tratamiento 1 con menor contenido de eritritol (20%), obtuvo la mejor calificación en color, valor que disminuyó según aumentaba la cantidad de este edulcorante en el chocolate (Ver tabla 14). Tal es el caso de Lin *et al.* (2006), quien estudió el efecto de la sustitución del 25%, 50%, 75% y 100% de sacarosa con eritritol en tartas, observando que a medida que la cantidad de eritritol aumentaba, las puntuaciones medias para la evaluación de color de la corteza de los alimentos también disminuían.

Tabla 15
Promedio \pm error estándar de la
aceptabilidad del dulzor de chocolate
edulcorado con eritritol y stevia

| Tratamiento | Dulzor | |
|----------------|-----------------|----|
| T0 | 3.06 \pm 0.15 | AB |
| T1 | 2.82 \pm 0.13 | B |
| T2 | 3.35 \pm 0.13 | A |
| T3 | 3.45 \pm 0.13 | A |
| p-valor | <0.0001 | |
| F-valor (3,25) | 4.48 | |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

La prueba de ANAVA realizada muestra una diferencia estadística significativa (F (3,256) 4,481 $p = <0,0001$) entre las medias de los tratamientos (Ver tabla 15). La puntuación más baja presentó el tratamiento 1 que contenía el menor porcentaje de eritritol (20%) en su fórmula, mientras que la mejor calificación fue obtenida por el tratamiento 2 y 3 con eritritol al 30% y 40%, respectivamente. Lo que no sucede en un estudio realizado por Lin *et al.* (2006), donde las puntuaciones medias de dulzor disminuyeron a medida que la cantidad de eritritol aumentó. El eritritol en el presente estudio fue combinado con stevia en cantidades menores al 1%; lo cual mejoró su sabor y potencializó el dulzor mejorando la aceptabilidad, tal como menciona Bordoni *et al.*, (2010), corroborando que el eritritol exhibe sinergismo con endulzantes de alta potencia.

Tabla 16
Promedio \pm error estándar de la
aceptabilidad general de chocolate
edulcorado con eritritol y stevia

| Tratamiento | Aceptabilidad general | |
|----------------|-----------------------|---|
| T0 | 3.64 \pm 0.15 | A |
| T1 | 3.62 \pm 0.14 | A |
| T2 | 3.58 \pm 0.15 | A |
| T3 | 3.74 \pm 0.16 | A |
| P-valor | 0.502 | |
| F-valor (3.25) | 7.87 | |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

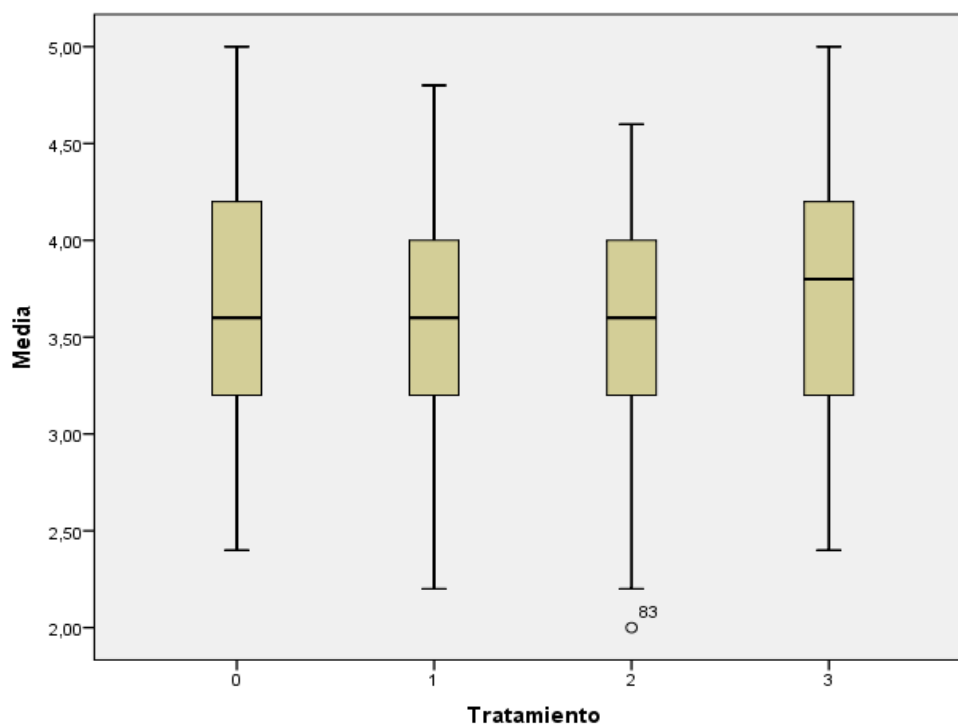


Figura 19 Diagrama de Box - Plot de aceptabilidad general de los tratamientos, se identifican medias de valores similares y presencia de intervalos de confianza sobrepuestos indicando que no existen diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados del ANAVA no muestran una diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos ($F(3,256) = 7.87$; $p=0,502$) (Ver tabla 17; figura 19). En una investigación realizada por Rodríguez (2014), en donde se evaluó el efecto de los polioles en la nutrición y sus aplicaciones en la industria alimentaria, se concluyó que los polioles pueden ser utilizados como sustitutos de azúcar en productos horneados ya que proporcionan texturas y características organolépticas similares a la sacarosa. Así mismo se observó que en chocolates y caramelos se puede realizar esta sustitución, sin mucho efecto sobre las propiedades físicas, propiedades químicas o características sensoriales.

4.2 Efecto de la inhibición de chocolate edulcorado con eritritol + stevia sobre *S. mutans*

Tabla 17

Promedio \pm error estándar de las Unidades Formadoras de Colonia por ml de muestra de chocolate edulcorado con eritritol y stevia

| Tratamiento | UFC/ml | |
|-------------|--------------------------|---|
| T0 | 1.34E+10 \pm 0.25E+010 | B |
| T1 | 8.20E+09 \pm 2.22E+09 | A |
| T2 | 5.40E+09 \pm 1.41E+09 | A |
| T3 | 1.78E+10 \pm 5.91E+10 | B |
| P-valor | <0.001 | |
| F (3.16) | 19.27 | |

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p>0.05$).

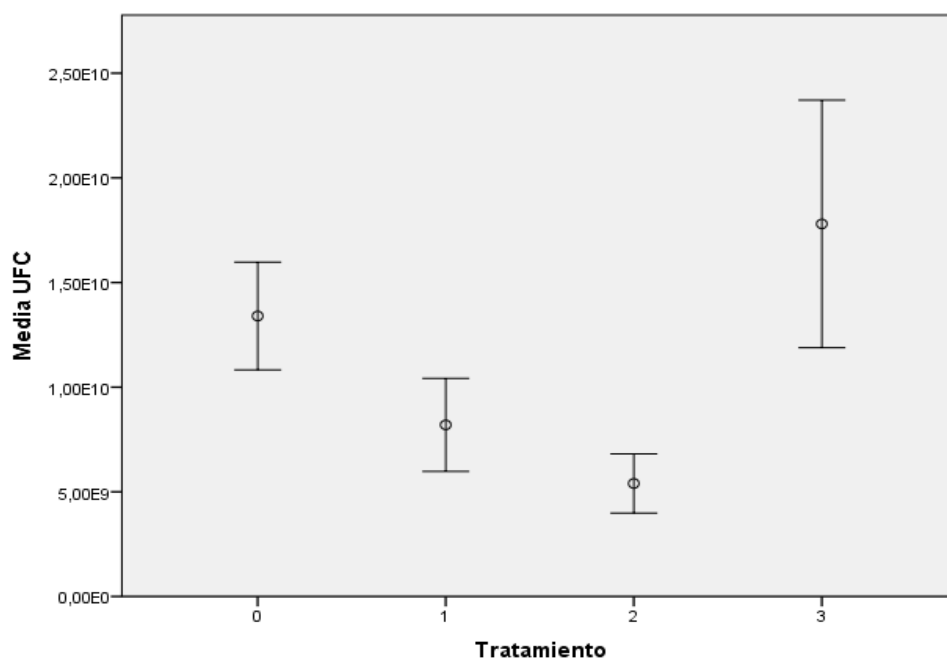


Figura 20 Diagrama de barras de error del número de Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml) de cada tratamiento. Medias similares y presencia de intervalos de confianza sobrepuestos indican que no existen diferencias estadísticamente significativas

El resultado de la prueba ANAVA indica diferencias significativas entre tratamientos ($F(3,16) = 19,268$; $p < 0,001$). El tratamiento 0 con sacarosa al 30% desarrolló un mayor número de colonias ($1,3400E+010 \pm 0,2575E+010$) frente a los tratamientos 1 (eritritol 20% + stevia 0.5%) y 2 (eritritol 30% + stevia 0.3%) (Ver tabla 17). No hay diferencias significativas entre los tratamientos 1 y 2 teniendo índices de crecimiento bacteriano similares (figura 20).

Por otra parte, se pudo observar que el tratamiento 0 (sacarosa 30%) y el tratamiento 3 (eritritol 40% + stevia 0.1%), no tuvieron diferencias significativas en el número de unidades formadoras de colonias por ml de muestra (Ver figura 20), desarrollando un crecimiento bacteriano estadísticamente similar. Lo que sugiere que porcentajes de inclusión de eritritol en chocolate, superiores al 30%, genera un producto con el mismo potencial cariogénico que el chocolate azucarado

En un estudio realizado por Arias (2016), se investigó la efectividad inhibitoria *in vitro* del eritritol al 1%, 8% y 16% de concentración en BHI sobre cepas de *S. mutans*, con un menor crecimiento al 16%; encontrando que el eritritol por su naturaleza no calórica, no es metabolizada por la bacteria como energía y no permite la producción de ácidos en la cavidad bucal, deteniendo el proceso carioso. Del mismo modo Kawanabe (1992), Wu *et al.*, (2012), Yao & Zhang (2012), en sus investigaciones obtuvieron efectos de inhibición significativos del eritritol sobre *S. mutans*, encontrándose que este poliol no fue utilizado por las bacterias como sustrato para la formación de placa dental, sin lograr por otra parte la formación de ácido láctico. Sin embargo, cabe mencionar que no se identificó un papel importante en la destrucción de las paredes celulares de la bacteria por parte del eritritol, determinando que su poder inhibitorio se debe a un efecto bacteriostático mas no bactericida, ya que al ser un poliol no metabolizable por las bacterias, impide la proliferación de las mismas en la boca.

4.3 Análisis de costos

En la siguiente tabla se muestran los costos de los diferentes ingredientes, así como de mano de obra y uso de equipos, necesarios para la elaboración de tabletas de chocolate dark de 50 gramos.

Tabla 18
Costos de elaboración de los tratamientos de chocolate
(50 g) edulcorados con eritritol y stevia

| | T0 | T1 | T2 | T3 |
|-------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| ITEM | Costo \$ | Costo \$ | Costo \$ | Costo \$ |
| Pasta de cacao | 0,06 | 0,07 | 0,07 | 0,05 |
| Manteca de cacao | 0,04 | 0,04 | 0,04 | 0,04 |
| Lecitina | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| Sacarosa | 0,02 | - | - | - |
| Eritritol | - | 0,15 | 0,23 | 0,30 |
| Stevia | - | 0,01 | 0,01 | 0,003 |
| Mano de obra (4 horas) | 0,44 | 0,44 | 0,44 | 0,44 |
| Uso de equipos | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| Total | 0,62 | 0,77 | 0,84 | 0,89 |
| Costo+ 40% de utilidad | 0,99 | 1,26 | 1,36 | 1,45 |

Se pudo observar que el costo total de cada tratamiento varió según el porcentaje utilizado de eritritol y stevia, siendo los costos de las formulaciones con estos edulcorantes 34% más elevados que el tratamiento que contiene sacarosa.

Los siguientes precios de venta para chocolates dark edulcorados con sacarosa y endulzantes no calóricos, se obtuvieron de locales comerciales como Fybeca y Megamaxi (Ver tablas 19 y 20).

Tabla 19
Precios comerciales de chocolates dark (50 g)
edulcorados con sacarosa

| Marca | % Cacao | \$ |
|------------------------|----------------|-------------|
| Hoja verde | 66 | 3,00 |
| Hoja verde | 80 | 2,55 |
| República del cacao | 71 | 3,05 |
| República del cacao | 56 | 3,05 |
| Minka | 65 | 3,47 |
| Minka | 100 | 3,47 |
| Minka | 70 | 3,47 |
| Revillion chocolatier | 56 | 2,63 |
| Caoni | 77 | 2,80 |
| Caoni | 80 | 2,75 |
| Pacari | 100 | 3,31 |
| Pacari | 60 | 2,54 |
| Bios | 63 | 2,57 |
| Precio promedio | | 2,97 |

*Las empresas de las marcas mencionadas manejan costos de producción que consideran escalamiento de costos, incluyendo publicidad, gastos administrativos y legales, entre otros.

Tabla 18
Precios comerciales de chocolates dark (50 g)
endulzados con edulcorantes no calóricos

| Marca | % Cacao | \$ |
|--|----------------|-------------|
| Yanakuri (fructosa + sucralosa) | 95 | 2,12 |
| Valor (maltitol + stevia) | 70 | 2,82 |
| Valor (maltitol + stevia) | 52 | 2,60 |
| Bios (maltitol + glúcidos de esteviol) | 65 | 2,03 |
| Precio promedio | | 2,39 |

Tomando estos precios referenciales, se pudo observar que incluyendo el 40% de utilidad a los costos de los tratamientos propuestos, los chocolates elaborados eritritol + stevia, siguen siendo más económicos que aquellos que contienen sacarosa y otros edulcorantes no calóricos, manteniendo las diferencias con empresas ya establecidas.

4.4 Protocolo de elaboración de chocolate con 30% eritritol + 0.3% stevia

En base a las pruebas de degustación y el análisis microbiológico, el tratamiento 2 (chocolate con 30% eritritol + 0.3% stevia), obtuvo los mejores resultados en cuanto a dulzor, con aceptabilidad general similar a la sacarosa y el mejor control del crecimiento *in vitro* de *Streptococcus mutans*. El protocolo de elaboración es el siguiente:

1. Adquirir semillas frescas de cacao fino de aroma y someter al proceso de fermentación por 72 horas en cajas de madera de 60 cm x 25 cm recubiertas con hojas de plátano a 40-55 °C. Remover las almendras cada 48 horas a fin de uniformizar la fermentación y evitar el crecimiento de microorganismos no deseados, que pueden alterar el sabor del cacao.
2. Exponer las semillas al calor directo del sol sobre un plástico negro en una superficie plana durante 72 horas, para lograr el desprendimiento de la humedad procurando un secado homogéneo.
3. Seleccionar las almendras de color y tamaños uniformes, completamente secos y libres de hongos. Descartar a aquellas pequeñas, vanas e impropias para el procesamiento.
4. Tostar las semillas durante 25 minutos a una temperatura de 100 a 150 °C, sin dejar de removerlas para obtener un tostado uniforme. Retirar la corteza de los granos cuidadosamente.

5. En un molino de disco triturar de dos a tres veces los cotiledones de cacao, a fin de reducir al menor tamaño las partículas y modificar su textura. Durante este proceso será necesaria la generación de calor por la fricción, lo cual permitirá la fundición de la manteca del cacao a los 32°C dando origen al licor de cacao.

6. A una temperatura constante de 45 a 55 °C mezclar los siguientes ingredientes:
 - Pasta de cacao (60,7%)
 - Manteca de cacao (7%)
 - Lecitina (2%)
 - Eritritol (30%)
 - Estevióside (0,3%)

Mezclar hasta obtener una masa pastosa consistente y uniforme, eliminando los grumos y residuos de los edulcorantes y aditivos.

7. Mantener la masa de chocolate a una temperatura de 40 a 50 °C, posteriormente colocar sobre una tabla de mármol o granito y enfriar a 28 °C a fin de que los cristales de la manteca alcancen estabilidad, aportando brillo y untuosidad al chocolate. Recalentar la masa hasta alcanzar los 32 °C para facilitar la recristalización de la manteca y el proceso de moldaje.

8. Dosificar el chocolate en los moldes, en estado semisólido (28-30 °C), dejar enfriar a temperatura ambiente durante 15 minutos y colocar en refrigeración 4°C durante 24 horas.

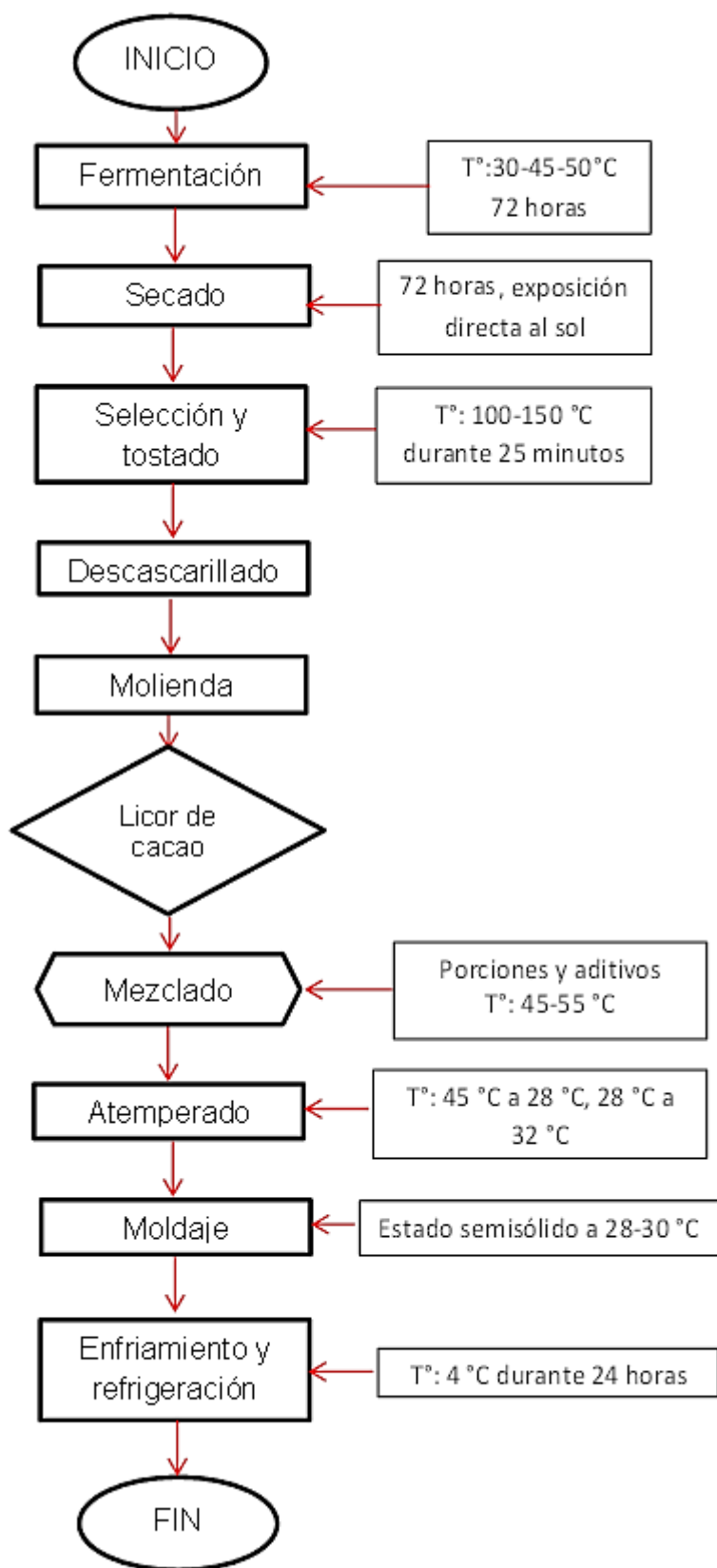


Figura 21 Diagrama de Flujo de la elaboración del Chocolate

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Los chocolates endulzados con eritritol + stevia tuvieron un grado de aceptación organoléptica similar a los endulzados con sacarosa, por lo tanto, el eritritol y la stevia pueden ser utilizados como sustitutos del azúcar, sin afectar las características sensoriales en el chocolate ni su aceptación por parte de los consumidores.
- El uso de eritritol + stevia en chocolate inhibió de forma significativa el crecimiento de *Streptococcus mutans* en las formulaciones que contenían el 20% de eritritol + 0.5% de stevia y 30% de eritritol + 0.3% de stevia, mientras que al 40% y 0.1%, respectivamente, produjo un crecimiento bacteriano similar a la sacarosa.
- El costo de elaboración a nivel de laboratorio, de 50 gramos de chocolate endulzado con eritritol + stevia, varió según los porcentajes utilizados de edulcorantes en cada caso. El costo promedio de las formulaciones sin azúcar fue 34% más elevado que el tratamiento que utilizó sacarosa. Sin embargo, aún al agregar a estos valores una utilidad del 40%, sus precios tentativos resultaron ser mucho más económicos frente a chocolates de otras marcas comerciales con características similares, las cuales guardan el concepto de escalamiento de costos.
- Se desarrolló el protocolo de sustitución de sacarosa por eritritol + stevia en chocolate, del tratamiento que controló eficazmente el crecimiento de *Streptococcus mutans* y fue organolépticamente aceptado.

5.2 Recomendaciones

- Con respecto a la elaboración de chocolate con este tipo de edulcorantes, se recomienda alargar el tiempo de mezcla hasta diluir por completo los ingredientes, ya que se observó un cambio en la textura y la granulometría en los tratamientos, sobre todo en aquellos con mayor contenido de eritritol.
- Se recomienda realizar estudios *in vivo* sobre el efecto de inhibición bacteriana del chocolate edulcorado con eritritol + stevia, ya que la interacción de estos edulcorantes con la microflora oral puede variar.
- Dada la baja efectividad de inhibición bacteriana del chocolate con 40% de eritritol + 0,1% de stevia, se recomienda ampliar las investigaciones sobre el uso de cantidades superiores al 30% de eritritol en chocolate.
- Los costos de elaboración obtenidos en este proyecto son de carácter referencial, ya que las formulaciones fueron realizadas en cantidades representativas para los ensayos pertinentes. Se recomienda realizar un estudio de factibilidad más desarrollado, con lo cual se podrá obtener el rendimiento económico y la viabilidad real de los productos propuestos.

5.3 Bibliografía

- Agell, O. (2000). *La seguridad alimentaria del chocolate*. Obtenido de Observatori de Seguretat Alimentaria: http://www.censalud.ues.edu.sv/CDOC-Deployment/documentos/19_LA_SEGURIDAD_ALIMENTARIA_DEL_CHOCOLATE.pdf
- ANECACAO. (2015). *Cacao Nacional*. Obtenido de <http://www.anecacao.com/es/quienes-somos/cacao-nacional.html>.
- Anesto, J. (2002). Consumir azúcar con moderación. *Revista Cubana Aliment Nutr*, 142-145.
- Arguello, O., Mejía, A., & Palencia, G. (2000). *Clasificación de especies cultivares de Theobroma cacao L. para el mejoramiento del sistema de multiplicación de cacao*. Corpoica - Colombia.
- Arias, K. (2016). *Efectividad inhibitoria del erythritol al 1%, 8% y 16% de concentración sobre cepas de Streptococcus mutans; estudio in vitro*. Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.
- Ártica, M. (2008). *Cultivo de cacao* (Segunda ed.). Perú: MACRO.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos* (Cuarta ed.). México: E. Quintanar.
- Beckett, S. (2009). *Industrial Chocolate Manufacture and Use*. York, UK: Blackwell Publishing.
- Bernt, W., Borzelleca, J., Flamm, G., & Munro, I. (1996). Erythritol: a review of biological and toxicological studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 191-197.

- Bordoni, N., Escobar, A., & Mercado, R. (2010). *Odontología pediátrica. La salud bucal del niño y el adolescente del mundo actual* (Primera ed.). Barcelona, España: Blume.
- Braudeau, J. (1975). *El cacao, técnicas agrícolas y producciones tropicales* (Primera ed.). Barcelona, España: Blume.
- Calderón, L. (2002). *Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (Theobroma cacao L.) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Licenciatura Química, Quito - Ecuador.
- Camino, C. (2014). *Estudio del contenido de grasa, alcaloides y polifenoles totales en almendras de cacao nacional fino de aroma en zonas del litoral ecuatoriano para comparar su calidad y facilitar su comercialización*. Universidad Técnica de Ambato, Ambato - Ecuador.
- Cerón, S. (2016). *Efecto de la sustitución parcial y total de azúcar por edulcorantes artificiales (aspartame, sacarina, sucralosa) en las propiedades organolépticas del helado de agua sabor a fresa*. Universidad Politécnica Estatal del Carchi, Ingeniería en Desarrollo Integral Agropecuario, Tulcán - Ecuador.
- Cubero, N., Monteferrer, A., & Villalta, J. (2002). *Aditivos alimentarios*. Mundi Prensa.
- de Cock, P., Mäkinen, K., Honkala, E., Saag, M., Kennepohi, E., & Eapen, A. (2016). Erythritol is more effective than Xylitol and Sorbitol in Managing oral Health Endpoints. *International journal of dentistry*.
- Díaz, L., Pinoargote, M., & Castillo, P. (2013). *Análisis de las características organolépticas del chocolate a partir de cacao CCN51 tratado enzimáticamente y tostado a diferentes temperaturas*. Escuela Politécnica del Litoral, Guayaquil - Ecuador.

- EUROPAPRESS. (2002). La sacarosa produce mayor aumento de peso que los edulcorantes artificiales en personas con sobrepeso. *Ciencia Plus*.
- Figueroa, M. (2011). *Diseño de planta para la elaboración de cobertura de chocolate para mercado internacionnal*. Universidad de las Américas, Quito - Ecuador.
- García Almeida, J., Casado, G., & García Alemán, J. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 17-31.
- Gonzales, A. (2015). *Manual de Postcosecha para el Cacao*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambaveque - Perú.
- González, A. (2011). Aproximación a la comprensión de un endulzante natural alternativo, la Stevia rebaudiana Bertoni: producción, consumo y demanda potencial. *Agroalimentara*, 17(32), 57-69.
- Guerrero, D., Girón, C., Madrid, A., Mogollón, C., Quiroz, C., & Villena, D. (2013). *Diseño de la línea de producción de chocolate orgánico*. Universidad de Piura, Ingeniería Industrial y de Sistemas, Piura-Perú.
- Hernández, E. (2005). *Evaluación Sensorial*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD, Bogotá-Colombia.
- INIAP. (2009). Entorno Ambiental, Genética, Atributos de Calidad y Singularización del Cacao en el Nor Oriente de la Provincia de Esmeraldas. Boletín técnico n° 135. Quevedo - Ecuador.
- Kawanabe, J., Hirasawa, M., Takeuchi, T., Oda, T., & Ikeda, T. (1992). Non-cariogenicity of erythritol as a substrate. *Caries Research*, 26(5), 358-362.
- Liébana, J. (2002). *Microbiología Oral* (Segunda ed.). Mc Graw-Hill Interamericana de España.

- Linossier, A., & Valenzuela, C. (2011). Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus mutans* según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. *Revista Chil Infect*, 28(3), 23-27.
- Linossier, A., Carvaja, P., Donoso, E., & Orrego, M. (1999). Fluorosis dental recuento de *Streptococcus mutans* en escolares provenientes de la Primera Región de Chile. Estudio longitudinal. *Revista médica de Chile*, 127(12), 1462-1468.
- López, A. (2000). *Tecnología para la producción de cacao en Tabasco*. Tabasco - México.
- López, A., & Canales, M. (2004). *Edulcorantes*. México: L. Noriega.
- Martínez, J. (2008). *Diagnóstico de la comercialización del cacao (Theobroma cacao L.) neocriollo y convencional en Cunduacan Tabasco, México*. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Tabasco-México.
- Martínez, T. (2002). La Hierba Dulce. Historia, Usos y Cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Ciencias de la Salud*.
- Montalvo, M. (2011). *Ecuador de exportador del mejor cacao del mundo*. Flacso Andes.
- Negroni, M., & Marcantoni, M. (2009). *Microbiología y Estomatología de la Caries Dental*. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Ojeda, J., Oviedo, E., & Salas, L. (2013). *Streptococcus mutans* and dental caries. *CES Odontology*, 26(1), 44-56.
- Orellana, C. (2016). *Efecto inhibitorio del xilitol a diferentes concentraciones sobre el streptococcus mutans aislado de la saliva de niños (as) de 6 a 7 años de la Unidad Educativa Municipal "San Francisco de Quito": estudio in vitro*. Universidad Central de Ecuador, Quito - Ecuador.

- Pedraza, D., & Hernández, Y. (2006). *Diseño y valoración de un medio de cultivo selectivo (SULBAC) para streptococcus mutans*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá - Colombia.
- Plazas, L. (2015). *Recuento e Identificación de Streptococcus mutans de saliva en niños con caries dental Seguimiento a 3 y 6 meses después de un proceso educativo*.
- Ponce, T. (2013). *Los diabéticos también pueden complacer su paladar*. Obtenido de Revista Líderes: <http://www.revistalideres.ec/lideres/diabeticos-complacer-paladar.html>.
- Ramírez, M. (2007). *Susceptibilidad antimicrobiana y diversidad genética en cepas de Shigella aisladas en Cuba*. Instituto de Medicina Tropical Pedro Loun, La Habana - Cuba.
- Rodríguez García, A. (2012). *Manual para la educación nutricional en la secundaria básica*. La Habana: Editorial Universitaria.
- Rodríguez, M. (2014). *Efectos de los polioles en la nutrición y sus aplicaciones en la industria alimentaria*. Universidad de Valladolid, Valladolid - España.
- Runnel, R. M., Honkala, S., Olak, J., Mäkinen, P., Nõmmela, R., & Saag, M. (2013). Effect of three-year consumption of erythritol, xylitol and sorbitol candies on various plaque and salivary caries-related variables. *Journal of dentistry*, 41(12), 1236-1244.
- San Martín, L., Aulla, M., & Pico, F. (2010). *Proyecto de creación de una empresa de producción y comercialización de chocolates gourmet*. Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.
- Sánchez Gómez, M. (2014). *Edulcorantes: Utilización y aprovechamiento en diferentes procesos de la industria alimentaria*. Universidad Autónoma de México, Toluca - México.

- Sánchez, I., & Rubio, A. (2010). Atención Farmacéutica en la Enfermedad Periodontal con plantas medicinales. *Offam*, 29(4), 62-67.
- Sánchez, L., & Acosta, E. (2007). Estreptococos cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en un grupo de escolares. Estudio exploratorio. *Revista ADM*, 64(2), 45-55.
- Serrano, B., & Zambrano, B. (2016). *Elaboración de confitería a base de chocolate con edulcorantes no calóricos*. Universidad de Cuenca, Cuenca - Ecuador.
- Suárez, C., Moreira, D., Vera, B., & Vera, J. (1993). *Manual de cultivos de cacao*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Quevedo - Ecuador.
- Suczhañay, M. (2015). *Efecto antimicrobiano de extractos acuosos de cáscara y semillas de cacao (Theobroma cacao L.) sobre cepas de Streptococcus mutans. Estudio in vitro*. Universidad Central del Ecuador, Quito - Ecuador.
- Torres, L. (2012). *Manual de producción de cacao fino de aroma a través de manejo ecológico*. Universidad de Cuenca, Cuenca - Ecuador.
- Valdés, S., & Ruiz, M. (2009). Edulcorantes en alimentos: aplicaciones y normativas. *Énfasis Alimentación*.
- Valenzuela, A. (2007). El chocolate, un placer saludable. *Revista chilena de nutrición*, 34(3), 180-190.
- Watts, B., Ylimaki, G., Jeffrey, L., & Elías, L. (1992). *Métodos sensoriales básicos para la evaluación de alimentos*. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa - Canadá.
- Wu, C., White, M., Maitra, A., & Dodds, M. (2012). *Effect of erythritol on Streptococcus mutans growth and biofilm*. UIC College of Dentistry,

Department of Pediatric Dentistry and the Wm. Wrigley Jr. Company,
Chicago IL.

Yao, J., & Zhang, J. (2012). Estudio experimental del mecanismo de acción del eritritol sobre *Streptococcus mutans*. *Diario de Estomatología - Huaxi*, 603-605.