

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS
ALIMENTARIAS**



**Efecto de la adición de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*)
sobre las características sensoriales y capacidad de inhibición
microbiana de chocolate edulcorado con xilitol**

**Tesis para optar el título profesional de:
Ingeniera en Industrias Alimentarias**

**Presentado Por:
Bach. Marleni Martinez Huillca**

**Asesor:
Mg. Julio Fernando Pérez Sáez**

Ayacucho - Perú

2024

DEDICATORIA

Dedico inicialmente esta obra al Dios todopoderoso que siempre nos ha incluido en su bondad sin límites.

A mi padre por su apoyo incondicional con sus consejos y motivación, a lo largo de mi logro profesional.

A mi pareja por su apoyo incondicional para hacer realidad este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer sinceramente a las siguientes personas su ayuda para hacer posible este trabajo de investigación:

Por todos los conocimientos que me enseñaron durante mi formación universitaria, agradezco a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia, y en especial a los docentes de la Escuela Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias.

Gracias a Mg. Julio Fernando Pérez Sáez por su orientación y ayuda en la supervisión y seguimiento de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de manera especial a los docentes de la Escuela Profesional de Biología por todo el apoyo brindado para la ejecución de este trabajo de investigación

A la Mg. Kusi Yaranga Palomino, por su orientación y ayuda en la planificación, realización y finalización de este proyecto de investigación.

Mi más profundo agradecimiento a todos los que han contribuido a hacer posible este esfuerzo, por pequeño o grande que sea.

A la empresa Royal Raymi S.A.C, en especial a la gerente general Ing. Doris Paucar Pizarro, por haberme brindado el apoyo para la elaboración del producto en sus instalaciones

Al gerente de la cooperativa agraria Qori Warmi LTDA, por haberme brindado la materia prima para realizar el producto

RESUMEN

El propósito de este proyecto de estudio fue desarrollar un producto sustituto para combatir la prevalencia de la caries dental en nuestra nación y región. Se estima que el 90,4% de los peruanos sufre de caries dental, un problema de salud pública según el MINSA, (2019), que se produce por causas multifactoriales, los cuales involucran la dieta en especial el consumo de sacarosa y similares, la cantidad de población microbiana en la cavidad bucal, siendo uno de los principales iniciadores la bacteria *Streptococcus mutans*, esto acompañado del consumo excesivo de productos de confitería cuyo edulcorante principal es la sacarosa, este insumo es el principal nutriente de la bacteria mencionada, para luego poder seguir su ciclo vital pudiendo adherirse a la pieza dental.

El objetivo general de este trabajo de investigación fue elaborar chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol y adición del aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) para evaluar su efecto en sus características sensoriales e inhibición microbiana.

La metodología para el desarrollo del objetivo fue en las siguientes etapas, primero se realizó la obtención del chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol mediante sus componentes (pasta de cacao 70% y xilitol 30%), en la segunda etapa se incorporó al chocolate el aceite de copaiba en concentraciones de (80 ppm, 100 ppm, 120 ppm) en el proceso de atemperado del chocolate, mediante el atemperado por siembra en superficie de granito, siendo 3 tratamientos y 1 testigo (00 ppm de aceite de copaiba), las variables de respuesta fueron, tamaño de halo de inhibición microbiana (mm), nivel de aceptación en sabor, color, olor mediante la calificación de una escala hedónica de 7 puntos con 50 jueces consumidores.

El mayor valor de la media para el chocolate elaborado fue 5,88 (tratamiento con 120 ppm) con respecto al color, 5,5 (tratamiento con 120ppm y 100ppm) para el olor, 5,74 (tratamiento con 120ppm) para el sabor en la escala hedónica de 7 puntos, del cual se tiene 1 tratamiento que tiene la mayor media en las tres indicadores sensoriales evaluados, que corresponde al tratamiento D (chocolate con 120ppm de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*), el cuanto a la significancia entre los tratamientos, para el color, olor no hubo diferencia significativa con un nivel de confianza al 95%, para el caso del sabor se tuvo diferencia altamente significativa para el tratamiento D con $p < 0,05$.

La mayor media para el tamaño de halo de inhibición microbiana que se obtuvo fue 26 mm correspondiente a clorhexidina al 0,12%, seguido por 15mm para el tratamiento de chocolate con 120ppm de aceite de copaiba, en cuanto al ANOVA entre los 3

tratamientos evaluados, se tiene una diferencia significativa entre los tratamientos, evaluado con un nivel de confianza al 95%, $p=0,036$, siendo $<0,05$, entre los tratamientos que tiene esta significativa es el chocolate con 120ppm de aceite de copaiba. Para la prueba de DUNCAN entre los tratamientos se tiene una diferencia significativa entre el tratamiento de chocolate con 80ppm y 120ppm de *A. copaiba*. Para el caso de contenido de metales pesados, se tiene un valor menor a 0,02mg/kg, siendo un nivel aceptable al comparar con las normas internacionales.

Palabras clave: chocolate, xilitol, *Copaifera officinalis*, *Streptococcus mutans*, caries, halo de inhibición, hedónica.

ABSTRACT

This research work was carried out in order to generate an alternative product to counteract the levels of dental caries in our region and country, it is known that dental caries is a public health problem that affects about 90,4% of the Peruvian population according to MINSA, (2019), which is produced by multifactorial causes, which involve diet, especially the consumption of sucrose and similar products, The amount of microbial population in the oral cavity, being one of the main initiators the *Streptococcus mutans* bacteria, this accompanied by the excessive consumption of confectionery products whose main sweetener is sucrose, this input is the main nutrient of the bacteria mentioned, then to continue its life cycle and can adhere to the tooth.

The general objective of this research work was to elaborate 70% cocoa chocolate sweetened with xylitol and the addition of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) to evaluate its effect on its sensory characteristics and microbial inhibition.

The methodology for the development of the objective was in the following stages, first the chocolate was obtained from 70% cocoa sweetened with xylitol by means of its components (70% cocoa paste and 30% xylitol), in the second stage the copaiba oil was added to the chocolate in concentrations of (80 ppm, 100 ppm, 120 ppm) in tempering of the chocolate, The response variables were the size of the microbial inhibition halo (mm), level of acceptance in flavor, color and odor through the qualification of a 7-point hedonic scale with 50 consumer judges.

The highest mean value for the elaborated chocolate was 5,88 (treatment with 120 ppm) for color, 5,5 (treatment with 120ppm and 100ppm) for odor, 5,74 (treatment with 120ppm) for flavor in the 7-point hedonic scale, of which 1 treatment has the highest mean in the three sensory indicators evaluated, corresponding to treatment D (chocolate with 120ppm of copaiba oil (*Copaifera officinalis*)). As for the significance between treatments, for color and odor there was no significant difference with a 95% confidence level, for flavor there was a highly significant difference for treatment D with $p < 0,05$.

The highest mean for the size of the microbial inhibition in mm obtained was 26 mm corresponding to 0,12% chlorhexidine, followed by 15 mm for the chocolate treatment with 120ppm of copaiba oil. As for the ANOVA between the 3 treatments evaluated, there was a significant difference between the treatments, evaluated with a confidence level of 95%, $p = 0,036$, being $< 0,05$, among the treatments that had this significant difference was chocolate with 120ppm of copaiba oil. For the DUNCAN test among the treatments,

there is a significant difference between the chocolate treatment with 80ppm and 120ppm of *A. copaiba*.

In the case of heavy metal content, the value is less than 0,02mg/kg, which is an acceptable level when compared to international standards.

Keywords: chocolate, xylitol, *Copaifera officinalis*, *Streptococcus mutans*, cavities, inhibition halo, hedonic.

INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
INDICE	viii
LISTA DE TABLAS	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	3
1.2.1 Problema general	3
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	4
1.3.1 Objetivo general	4
1.3.2 Objetivo específico	4
1.4 HIPÓTESIS	4
1.4.1 Hipótesis general.....	4
1.4.2 Hipótesis específica	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 ANTECEDENTES	6
2.1.1 Nacional.....	6
2.1.2 Internacional	7
2.2 CHOCOLATE	8
2.2.1 Tipos de chocolate	8
2.3 CACAO.....	9
2.3.1 Principales variedades de cacao	10
2.3.2 Producción de Cacao	12
2.3.3 Producción mundial del cacao	12
2.3.4 Demanda del Cacao en grano para molienda.....	15
2.3.5 Cacao Peruano	17
2.3.6 Situación del cacao a nivel nacional.....	18
2.4 POST COSECHA DEL CACAO	21
2.4.1 Quiebre de mazorcas	21
2.4.2 Extracción de semillas	21
2.4.3 Drenaje de mucílago	21

2.4.3 Fermentación.....	21
2.4.4 Secado.....	25
2.5 Procesamiento del cacao.....	28
2.5.1 Recepción de materia prima	28
2.5.2 Selección y limpieza de granos	29
2.5.3 Tostado.....	29
2.5.4 Molturación del Nibs de Cacao	31
2.5.5 Pasta de Cacao	31
2.6 PROCESAMIENTO DEL CHOCOLATE	31
2.6.1 Insumos	31
2.6.2 Mezclado	32
2.6.3 Refinado	33
2.6.4 Conchado	33
2.6.5 Temperado	33
2.6.6 Moldeado	36
2.6.7 Enfriado	37
2.6.8 Envasado y Almacenamiento	37
2.7 NORMA TÉCNICA PARA EL CHOCOLATE.....	37
2.7.1 CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL CHOCOLATE	37
2.8 ACEITE DE COPAIBA	37
2.9 CAVIDAD BUCAL	38
2.9.1 Visión general del diente	38
2.9.2 Saliva	39
2.10 STREPTOCOCCUS MUTANS	40
2.11 CARIES	41
2.11.1 Epidemiología.....	42
2.11.2 Causas principales	42
2.11.3 Tratamiento	44
2.12 ANTIBIOGRAMA.....	45
2.12.1 Halo inhibición	45
2.12.2 Escala Mac. Farland	45
2.13 MEDIOS DE CULTIVO	46
2.13.1 Agar tripticasa soya (TSA)	46
2.13.2 Agar Mueller Hinton (MH)	46
2.14 ANÁLISIS SENSORIAL	47
2.14.1 Pruebas afectivas.....	47
2.14. 2 Método estadístico de diseño experimental	48

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
3.1 MATERIALES	49
3.1.1 EQUIPOS	50
3.1.2 INSUMOS.....	50
3.2 MÉTODO.....	51
3.2.1 Elaboración del chocolate al 70% de cacao con xilitol al 30%	52
3.2.2 Descripción del proceso.....	53
3.2.3 Preparación de soluciones para la escala Mc Farland.....	56
3.2.4 Diagrama del diseño experimental para hala de inhibición microbiana de chocolate con aceite de copaiba.....	58
3.2.5 Evaluación sensorial del chocolate edulcorado con xilitol y adición de aceite copaiba	61
3.2.6 Evaluación estadística de resultados	61
3.2.7 Evaluación de contenido de metales pesados	63
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
4.1 Resultados de control de calidad en recepción de granos de cacao	64
4.2 Obtención del chocolate	64
4.3 Escala Mac Farland	65
4.4 Prueba de antibiograma para la inhibición microbiana	67
4.5 Evaluación de atributos sensoriales	71
4.6 Análisis de contenido de plomo, cadmio	75
CAPITULO V. CONCLUSIONES	76
CAPITULO VI. RECOMENDACIONES.....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
ANEXOS	87

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Requisitos de la composición de diferentes tipos de chocolate.....	8
Tabla 2.	Composición química de grano de cacao.....	10
Tabla 3	Producción de cacao de los principales productores	14
Tabla 4	Demanda de Cacao en grano para molienda por principales países.....	16
Tabla 5	Comparación de semillas de cacao fermentado	23
Tabla 6	Descripción de los granos fermentados	24
Tabla 7	Requisitos de calidad de cacao en grano seco.....	27
Tabla 8	Límites de metales pesados (cadmio, plomo) en las regulaciones internacionales.....	29
Tabla 9	Descripción del alcohol azúcar (Xilitol)	32
Tabla 10	Límites permisibles de microorganismos en chocolates.....	37
Tabla 11	Combinación de soluciones para escala Mac Farland.....	46
Tabla 12	<i>Tostador</i>	53
Tabla 13	Descascarillador.....	54
Tabla 14	Molino de disco	54
Tabla 15	Refinador de rodillos	55
Tabla 16	Combinación de soluciones para escala Mac Farland.....	57
Tabla 17	Calificación mediante la escala hedónica.....	61
Tabla 18	Resumen de tratamientos para evaluación de Inhibición microbiana	64
Tabla 19	Absorbancia de la escala Mac Farland	66
Tabla 20	Resultados de las evaluaciones para halo de inhibición microbiana, con los 3 tratamientos y tres testigos.....	67
Tabla 21	ANOVA para la variable respuesta.....	68
Tabla 22	R^2 coeficiente de variación para el arreglo DCA	68
Tabla 23	ANOVA de los tratamientos de 80ppm 100ppm 120ppm	69
Tabla 24	Prueba de DUNCAN	69
Tabla 25	Prueba de DUNCAN entre los tratamientos.....	70
Tabla 26	Arreglo de bloque completamente azar atributos sensoriales del chocolate	71
Tabla 27	Prueba de DUNCAN para el color	72
Tabla 28	Prueba de DUNCAN para el olor.....	72
Tabla 29	ANOVA (Análisis de Varianza) para SABOR	73
Tabla 30	Prueba de medias de DUNCAN	74
Tabla 31	Análisis fisicoquímicos	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Fruto de cacao tipo forastero</i>	11
Figura 2	<i>Cacao criollo fruto maduro</i>	11
Figura 3	<i>Fruto maduro cacao trinitario</i>	12
Figura 4	<i>Los países principales productores de cacao en grano para el año 2020....</i>	13
Figura 5	<i>Evolución de producción de cacao de los principales países productores desde el año 2015 hasta 2021</i>	15
Figura 6	<i>Evolución de los principales países demandantes de cacao en grano para Molienda en los últimos 6 años</i>	17
Figura 7	<i>Comportamiento de la producción nacional de cacao en grano en los últimos 5 años</i>	18
Figura 8	<i>Producción regional de cacao en grano</i>	19
Figura 9	<i>Principales regiones productoras de cacao en Perú</i>	20
Figura 10	<i>Producción de cacao de enero-diciembre, en la región Ayacucho</i>	20
Figura 11	<i>Cacao fermentado</i>	22
Figura 12	<i>prueba de corte de cacao</i>	25
Figura 13	<i>Secado de los granos de cacao</i>	26
Figura 14	<i>Proyección que muestra la disposición de las cadenas alquílicas de los polimorfismos α, β, β'</i>	34
Figura 15	<i>Rangos de temperaturas para la formación estable de las seis formas cristalinas diferentes de la manteca de cacao.</i>	35
Figura 16	<i>Curva de temperado según tipo de chocolate</i>	36
Figura 17	<i>Histología del diente</i>	39
Figura 18	<i>Streptococcus mutans</i>	40
Figura 19	<i>Morbilidad de caries según rangos de edad en Perú</i>	42
Figura 20	<i>Fisiopatología de la caries</i>	43
Figura 21	<i>Diseño experimental para medición de halo de inhibición microbiana</i>	60
Figura 22	<i>método para determinación de contenido de metales pesados</i>	63
Figura 23	<i>Tabletas de chocolate al 70% de cacao</i>	65
Figura 24	<i>tubos del estándar de Mc Farland</i>	65
Figura 25	<i>Estándar Mac Farland</i>	66
Figura 26	<i>Distribución de tamaño de halo con control positivo y los tratamientos</i>	68
Figura 27	<i>Procedimiento ANOVA</i>	73

INTRODUCCIÓN

El chocolate es un producto que tiene un consumo per cápita de 0.53 kg de chocolate, siendo el 50% consumo nacional en la región lima y otro 50% en las demás regiones, además el Perú posee el 60% de las variedades de cacao a nivel mundial (MINAGRI, 2019), por esta razón el cacao es un producto nacional que podemos aprovechar para el procesamiento convirtiéndolo en un producto altamente comercial, más aún si este alimento le otorgamos un efecto beneficioso para la salud de la población peruana, que tiene una incidencia de caries. El 90,4% de peruanos tiene caries dental y el 85% padece de enfermedades periodontales las cuales son muy peligrosas para las gestantes y pacientes diabéticos (Ministerio de Salud (MINSA), 2019). Por ello en esta investigación se desarrollará un producto con efecto inhibitorio del desarrollo de *Streptococcus mutans*, agente etiológico principal en el desarrollo de la caries dental, teniendo como conocimiento inicial que el edulcorante xilitol no es un sustrato para el desarrollo del microorganismo mencionado, así como del efecto antimicrobiano del aceite esencial de copaiba.

La importancia de esta investigación es de ámbito nacional debido a la alta incidencia de caries de los peruanos, que pierden los dientes a causa de esta enfermedad, afectado por la alimentación inadecuada, además a causa del dolor dental optan por la extracción del diente, algunos no cuentan con fondos suficientes para reemplazar con un diente postizo. La caries dental por tanto afecta directamente en la nutrición al ser los dientes órganos importantes para la formación del bolo alimenticio. Es claro que el producto a formular no tiene efecto retroactivo, pero tendrá la propiedad de prevenir siendo un alimento, el objetivo general de esta investigación es elaborar chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol y adición del aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) para evaluar su efecto en sus características sensoriales e inhibición microbiana.

CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cacao se cultiva en 16 de los 24 departamentos de nuestro país, en el año 2018 la producción nacional fue de 135,000 toneladas a lo largo de 160,000 hectáreas. Las principales zonas de producción de cacao se ubican en los departamentos de San Martín, Junín, Ucayali, Cusco, Huánuco, Amazonas y Ayacucho que representan el 93% del total de la producción nacional. De acuerdo a la Organización Internacional del Cacao (ICCO), además el 75% de las exportaciones peruanas corresponden a cacao fino y de aroma, siendo un atributo diferenciador ante otros tipos de cacao. De la misma manera, el 90% de la producción de cacao y sus preparaciones se destina a la exportación, principalmente, a los mercados de EE.UU. y Europa. El Perú se mantiene como el noveno productor mundial de cacao en grano y segundo productor mundial de cacao orgánico (MINAGRI, 2019).

Por otro lado, en el Perú, el consumo de chocolate es de 0,5 Kg por persona al año, mientras que, en países como Suiza y Alemania, el consumo llega a 9 y 7,9 Kg, dentro de los atributos alimenticios del chocolate es el aporte a las sensaciones de bienestar humano, por el contenido de sustancias que se producen en la fermentación, tostado y en la planta misma (MINAGRI, 2019), así como la sensación de dulzor agradable que tienen los chocolates a los que se añade azúcar para este fin. El cacao tiene un contenido de al menos 1,2-2% de teobromina que es un compuesto nitrogenado que con tiene efecto a nivel de neurotransmisores que dan sensación de placer secretando la dopamina (Belitz et al., 2009)

Es conocido que el azúcar en general y la sacarosa en particular, son promotores de las caries, en especial cuando no hay una higiene debida de los dientes y boca facilitando el crecimiento de bacterias. Por otro lado, el Xilitol no es sustrato para el crecimiento de

la bacteria que causa la caries dental, debido a que esta bacteria (*Streptococcus mutans*) no puede utilizar el xilitol para su metabolismo. Con el uso del xilitol, a través del tiempo sobrevivirán menos bacterias del tipo que disminuye el pH que resulta con infección al tejido óseo dental, se forma menos placa y disminuye el nivel de ácidos que atacan las superficies de los dientes (California Dental Association, s.f).

Se menciona que las plantas pueden ser un sustituto de la medicina convencional de una manera más efectiva de costo beneficio. El aceite del tronco de copaiba (*Copaifera officinalis*) es sintetizada por células parenquimáticas, localizada en todas las partes del árbol. Es un líquido transparente con viscosidad y color variable compuesto por sesquiterpenos y diterpenos, en la medicina tradicional este producto es conocido por sus efectos analgésicos antimicrobianos y cicatrizantes (Moromi, y otros, 2018)

Según el Ministerio de Salud (2019), el 90,4% de peruanos tiene caries dental y el 85% padece de enfermedades periodontales las cuales son muy peligrosas para las gestantes y pacientes diabéticos, otro de los problemas que son causantes para la caries es la, enfermedad inflamatoria de origen infeccioso que se inicia como consecuencia del progreso de la gingivitis que no tuvo un tratamiento adecuado y que puede finalizar con la pérdida de los dientes afectados, también contribuido por las costumbres de los peruanos que son deficientes en la higiene dental.

Con este trabajo se quiere contribuir en la reducción de la prevalencia de la caries dental de la población peruana, promoviendo el consumo de chocolates que combinen las propiedades del xilitol y el aceite de copaiba en la reducción del desarrollo de *Streptococcus mutans*, causante de la caries.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 Problema general

¿Qué efecto tendrá la adición de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) sobre las características sensoriales y capacidad de inhibición microbiana de chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol?

1.2.2 Problema específico

¿Cuál será la proporción de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol que tiene el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de *Streptococcus mutans* causante de la caries dental?

¿Cuál será la proporción de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol que tiene el mínimo efecto sensorial en el producto final?

¿Cuál será la formulación de chocolate al 70% de cacao con sustitución total de sacarosa por xilitol y adición de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) que tenga capacidad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* causante de la caries y que tenga características sensoriales adecuadas para el consumidor?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo general

Elaborar chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol y adición del aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) para evaluar su efecto en sus atributos sensoriales e inhibición microbiana

1.3.2 Objetivo específico

Establecer la concentración de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol que tenga el mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano (*Streptococcus mutans*)

Establecer la proporción de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol que tenga el mínimo efecto sensorial en el producto final

Elaborar un chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol con diferentes concentraciones de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) con capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano (*Streptococcus mutans*) y atributos sensoriales adecuadas para el consumidor.

1.4 HIPÓTESIS

1.4.1 Hipótesis general

Es posible obtener un chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol y adición del aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) para evaluar su efecto en sus atributos sensoriales e inhibición microbiana (*Streptococcus mutans*) causante de la caries dental

1.4.2 Hipótesis específica

Es posible establecer la concentración de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol que tenga el mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano (*Streptococcus mutans*)

Es posible establecer la proporción de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol que tenga el mínimo efecto sensorial en el producto final

Se puede elaborar un chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol con diferentes concentraciones de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) con capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano (*Streptococcus mutans*) y atributos sensoriales adecuadas para el consumidor.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Nacional

Grillo, Inostroza, Wong, & Ybavaleta, (2019) realizaron un plan de negocio para crear una empresa que tiene por finalidad comercializar y desarrollar una marca de chocolate hipocalórico y libre de azúcar, en la cual determinaron su formulación del chocolate al 60% de cacao edulcorado con polioles teniendo la formulación, licor de cacao 46%, manteca de cacao 16%, poliol 37,5% y edulcorante 0,15-0,2%, esta formulación realizada por un equipo de consultores. García R., (2013) realizó la investigación que tuvo por objetivo demostrar el efecto antimicrobiano del aceite de *Copaifera officinalis* sobre las principales cepas bacterianas periodontopatógenas (ATCC) *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* a diversas concentraciones del aceite de copaiba, obteniendo que la concentración mínima inhibitoria para *Porphyromona gingivalis* corresponde a 1,56%. Asimismo, la concentración inhibitoria mínima para el *Fusobacterium nucleatum* corresponde a 50% de aceite de copaiba. La clorhexidina mostró mayor efectividad al tener efecto a una menor concentración. Demostrándose el efecto antimicrobiano del aceite de copaiba. Arroyo, et al, (2011) evaluaron la eficacia cicatrizante del aceite de copaiba obtenido de la corteza de *Copaifera officinalis*, comparado con omeprazol 20 mg, en pacientes con diagnóstico definitivo de úlcera péptica, con ensayo de 80 y 120 mg de aceite de copaiba cuyo resultado fue, significativo lográndose el 65% y 75% de cicatrización de la úlcera péptica con aceite de copaiba, respectivamente, contra 100% en el grupo de omeprazol, sin efectos adversos significativos.

Godoy, (2017) realizó el estudio sobre la actividad antimicrobiana del aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) frente a *Streptococcus mutans* en concentraciones de 5%, 10%, 15%, comparado con clorhexidina al 2%, estadísticamente significativa fue la diferencia

entre la clorhexidina al 2% como control, entre los tratamientos estadísticamente significativa fue el aceite de copaiba al 15%, mientras entre la comparación de medias de DUNCAN, no hubo diferencia estadísticamente significativa, entre los tratamientos de 10% y 15%, en cambio se tuvo diferencia estadísticamente significativa entre el 5% y 10%, aplicando un ANOVA a ($p=0,000$).

2.1.2 Internacional

Pirouzian, Hadi, & Azadmard, (2018) observaron el impacto de la combinación de manitol y xilitol en las características fisicoquímicas de un chocolate sin sacarosa. Teniendo en cuenta que todas las propiedades de calidad del chocolate sean las óptimas fue con la formulación de 28,24 gr de maltitol y 4,76 gr de xilitol tuvo la máxima conveniencia, siendo una sustitución al 100% de sacarosa. También, (Homayouni, Rasouli, Said, & Konar, 2019) Realizaron la definición de las condiciones óptimas mediante el uso de un diseño de mezcla reticular Simplex para la formulación de chocolate sin sacarosa producido en un molino de bolas, siendo su resultado la optimización de las variables ilustró que utilizando maltitol al 11,16 % p/p, xilitol al 8,9 % p/p e isomaltosa al 12,93 % p/p se produjo el chocolate con leche óptimo con la mayor conveniencia (1,00) sin variaciones no deseadas en las características reológicas y de calidad. Correa, (2017) evaluó el efecto antimicrobiano del chocolate amargo y chocolate edulcorado con xilitol en proporciones de 6 g de chocolate y de 1 a 6 g de xilitol frente a *Streptococcus mutans*, obteniendo con la que se concluyó inhibición significativa del chocolate edulcorado con xilitol sobre *Streptococcus mutans* donde el chocolate amargo y chocolate edulcorado con xilitol obtenido de las semillas de cacao (*Theobroma cacao*): considerando 6 g de chocolate y 1, 2, 3, 4, 5 y 6 g de xilitol si inhiben al *Streptococcus mutans*.

El uso de aceite esencial de copaiba es reciente para la comunidad científica a comparación con otros aceites esenciales, el estudio realizado para evaluar los efectos de la inclusión de aceite esencial de copaiba (*Copaifera officinalis* L.) al 0,05 y 0,1% como posible reemplazo del aditivo sintético butilhidroxitolueno (BHT) en hamburguesas de carnero durante 14 días de almacenamiento en vitrina refrigerada (4° C). La adición de aceite esencial de copaiba mostró un efecto antioxidante en hamburguesas de oveja ($P > 0,05$), reduciendo la oxidación de lípidos. El aceite esencial de Copaiba agregado al 0,05% mostró la actividad antioxidante más alta, disminuyó las pérdidas por cocción y retrasó la decoloración (pérdida de enrojecimiento) durante el almacenamiento; mejoró aún más, la ternura de las hamburguesas de oveja ($p < 0,05$). Dando como conclusión

que el aceite esencial de copaiba es un antioxidante natural prometedor para aumentar la vida útil de los productos cárnicos, además de ser una solución viable para reemplazar el antioxidante sintético BHT (Miranda, y otros, 2021)

2.2 CHOCOLATE

según la NTP-Codex stan 87 Sobre una base de materia seca, el chocolate debe incluir un mínimo de 35% de sólidos totales de cacao, de los cuales al menos un 18% son manteca de cacao y un 14% son sólidos de cacao no grasos (Instituto Nacional de Calidad, 2017, 1).

2.2.1 Tipos de chocolate

Según la NTP Codex stand se tiene 16 tipos de chocolate, como se describe en la siguiente tabla las más importantes

Tabla 1 *Requisitos de la composición de diferentes tipos de chocolate*

Tipos de Chocolates		manteca de cacao	extracto seco magro de cacao	total de extracto seco de cacao	materia grasa de la leche	total de extracto seco magro de leche	almidón /harina
Chocolate		≥ 18	≥ 14	≥ 35			
Chocolate a la taza		≥ 18	≥ 14	≥ 35			<8
Chocolate de cobertura		≥ 31	≥ 2,5	≥ 35			
Chocolate con leche			≥ 2,5	≥ 25	2,5-3,5	12 a 14	
Chocolate de cobertura con leche			≥ 2,5	≥ 25	≥ 3,5	≥ 14	
Chocolate blanco		≥ 20			2,5-3,5	≥ 14	
Chocolate amargo		≥ 22	≥ 18	≥ 40			

Nota: Tomado de (Instituto Nacional de Calidad, 2017, 8) esta tabla es el resumen referido a la NTP-Codex stan 87.

2.2.1.1 Chocolate amargo

De la traducción en inglés bitter es amargo, este chocolate también se conoce como chocolate dark debido al color más oscuro a diferencia del chocolate con leche, esta denominación se realiza al chocolate cuyo contenido de cacao es principalmente de mayor igual al 40% de cacao, siendo su característica principal el amargor mientras más aumente el porcentaje de cacao, esto principalmente porque la concentración del edulcorante disminuye proporcionalmente, el contenido de cacao en este caso se distribuye cómo mínimo mayor igual al 22% de manteca de cacao, mayor igual al 18% de extracto magro de cacao (Instituto Nacional de Calidad, 2017, 8)

2.3 CACAO

El árbol del cacao es un árbol mediano que crece en climas tropicales. Produce frutos en forma de mazorca o piña, de tamaños muy variados, desde alargados hasta casi redondos, y con surcos en la superficie. Los frutos maduros tienen tonos amarillos, rojo anaranjado y rojo carmesí oscuro. Cada especie tiene un número diferente de semillas por fruto; los criollos tienen entre 25 y 30 semillas por fruto, mientras que ciertos forasteros amazónicos tienen entre 60 y 70 semillas por fruto. Los frutos maduros pesan unos 450 g. A los cuatro o cinco años, un árbol empieza a producir frutos (Andino & Nestor, 2017, 15). *Theobroma cacao* pertenece a la familia Malvácea, subfamilia Sterculioideae (antes Sterculiaceae) y comprende 22 especies en seis secciones. Todas las especies crecen bajo el dosel de bosques tropicales lluviosos. Las especies del género *Theobroma cacao* es un árbol o arbusto semicaducifolio de hasta 12(—20) m de altura, y en cultivo se mantienen normalmente a 4 - 8 m, de follaje simple y fruto carnoso e indehiscente (mazorca). Las formas de la especie *Theobroma cacao* L. Se utilizan para cultivar todo el cacao que se produce para el mercado mundial. Sólo localmente se cultivan y utilizan otras especies de *Theobroma* (Dostert et al., 2020).

Clasificación taxonómica

Reino: plantae

Subreino: tracheobionta

División: magnoliophyta

Clase: magnoliopsida

Familia: Malvaceae

Género: *Theobroma*

Especie: cacao

variabilidad: criollo, forastero, trinitario (tres grupos genéticos) (Dostert et al., 2020)

Tabla 2*Composición química de grano de cacao*

Constituyentes		Porcentaje (%)
Grasa		54,0
Agua		5,0
Cenizas		2,6
Compuestos nitrogenados	Proteína Cruda	11,5
	Teobromina	1,2
	Cafeína	0,2
Carbohidratos	Mono y oligosacáridos	1,0
	Almidón	6,0
	Pentosas	1,5
	Celulosas	9,0
Polifenoles		6,0
Ácidos Carboxílicos		1,5
Otros Compuestos		0,5

Nota: Composición química de cacao en grano fermentado y secado al sol, Según a la investigación que se realizó, tomado de (Belitz et al., 2009, 961)

2.3.1 Principales variedades de cacao

a) Forastero

forastero es el cacao más común; su producción alcanza el 70% del total mundial. El árbol se caracteriza por resistir a las enfermedades. Se cultivan en Ghana, Nigeria, Costa de Marfil, Brasil, Costa Rica, República Dominicana, Colombia, Venezuela y Ecuador. (Andino & Nestor, 2017, 15). De color verde a verde pigmentado en el estado inmaduro, amarillo, rojo en estado maduro, de forma ovalada de cáscara liso a medio, la constitución del fruto es variable, con cáscara gruesa o ligeramente gruesa. Por mazorca se encuentran de 20 a 60 semillas. Inicio de producción del tercer al quinto año (C.A.C Pangoa Ltda., 2016, 14)

Figura 1

Fruto de cacao tipo forastero



Nota, (Olesiabilkei, 2017)

b) Criollo

Aunque el criollo es el cacao más fino que existe, menos del 10% del cacao mundial se produce con él. Se cultiva en Ecuador, Madagascar, Perú, Colombia, México, Nicaragua y Venezuela. Debido a su moderado amargor y suave aroma, este cacao puede crear sabores muy aromáticos que se destinan principalmente a chocolates de primera calidad (Andino & Nestor, 2017, 15). Se caracterizan por sus frutos de color verde- amarillo en el estado inmaduro y amarillo al madurar, con cáscara rugosa delgada a media. Por mazorca se encuentran de 20 a 40 semillas redondas de color violeta; inicio de producción del cuarto al sexto año (C.A.C Pangoa Ltda., 2016, 14).

Figura 2

Cacao criollo fruto maduro



Nota: Obtenido de (olesiabilkei, 2017)

c) Trinitario

Un híbrido producido mediante el cruce del criollo con el forastero se denomina trinitario. Actualmente, el 20% de la producción mundial procede de él. Sus orígenes se remontan al siglo XVIII en la isla de Trinidad, donde las calamidades naturales destruyeron los

cacaotales criollos originales, que más tarde fueron sustituidos por plantas forastero. Con el tiempo, estas últimas se cruzaron con las plantas de cacao criollo restantes, produciendo el Trinitario, un chocolate que posee ambos rasgos de sus antepasados (Andino & Nestor, 2017, 15). Cuando sus frutos están inmaduros, tienen un color verde rojizo, una textura un poco arenosa, una constricción basal variable y una cáscara de grosor fino a medio. En una mazorca hay de treinta a cuarenta y cinco semillas. A partir del tercer o cuarto año comienza la producción (C.A.C Pangoa Ltda., 2016, 14).

Figura 3

Fruto maduro cacao trinitario



Nota: Obtenido de (Olesiabilkei, 2017)

2.3.2 Producción de Cacao

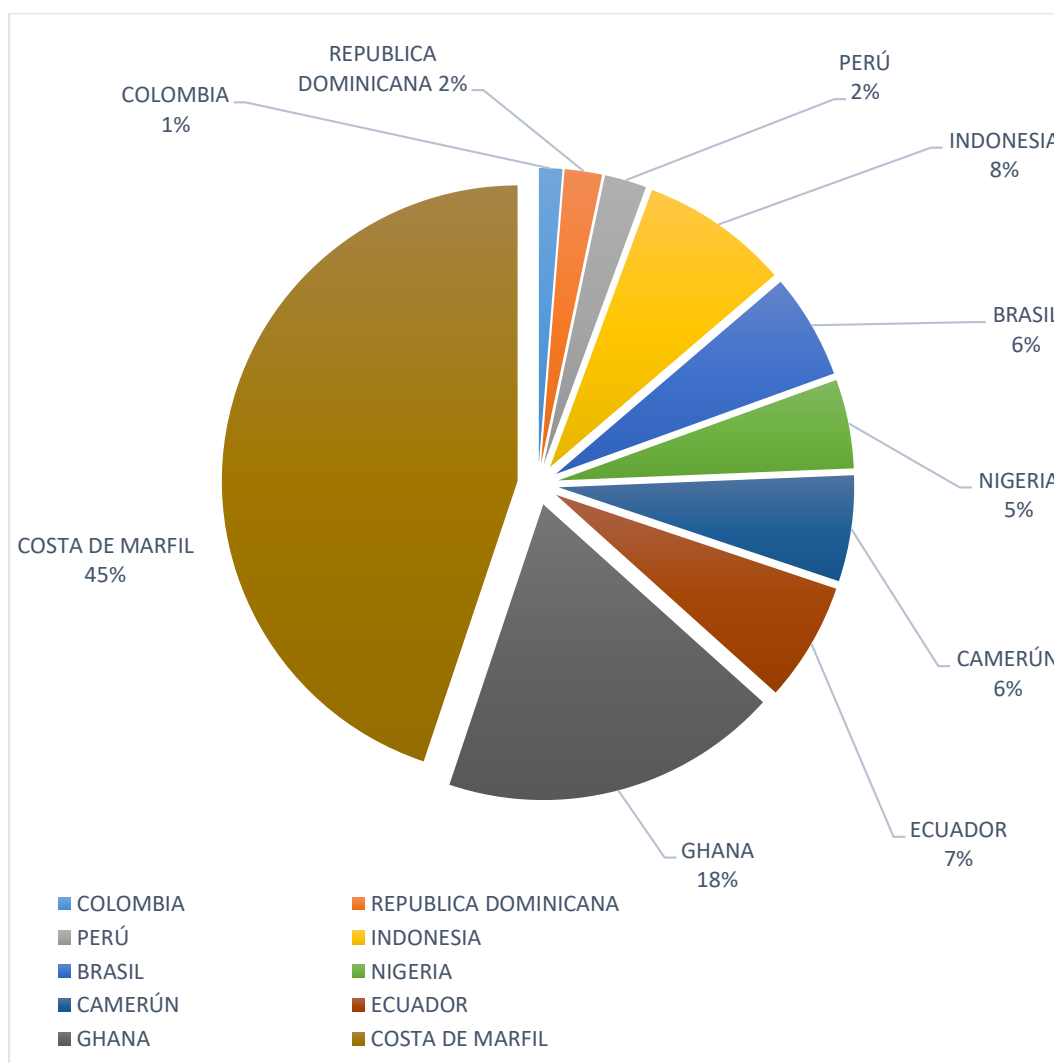
2.3.3 Producción mundial del cacao

En comparación con la temporada 2020/21 cuya producción estimada fue de 5226 millones de toneladas, se prevé que para el año 2022 la oferta de cacao caiga en un 5% a 4,955 millones de toneladas. Debido a que se está experimentando una sequía severa en los principales países productores de África occidental. Aunque se anticipa que el clima mejorará para la cosecha intermedia, la producción global para la temporada según estimación seguirá siendo más baja en comparación con el nivel histórico registrado para el año de cosecha anterior (Organización Internacional del Cacao, 2022).

En términos de cuota de la producción mundial total, África es la mayor región productora, con un 77% de la producción total. Las Américas y Asia y Oceanía se estiman en 18% y 5%, respectivamente (MINISTERIO DE DESARROLLO AGRARIO Y RIEGO(MIDAGRI), 2022, 4). A continuación, mencionaremos a los países principales productores de cacao en grano, siendo los más importantes los países del África seguido por los países de Sudamérica.

Figura 4

Los países principales productores de cacao en grano para el año 2020



Nota: En la figura se detalla el porcentaje de participación en la producción mundial de los 10 principales países, los datos fueron extraídos de (MIDAGRI, 2022).

la producción de cacao en grano a nivel mundial estaba cambiando, aunque para algunos países fue muy poco el cambio y para algunos muy significativo, a continuación, mostramos la tabla 2 de datos desde el año 2015 (MIDAGRI, 2022)

Tabla 3*Producción de cacao de los principales productores*

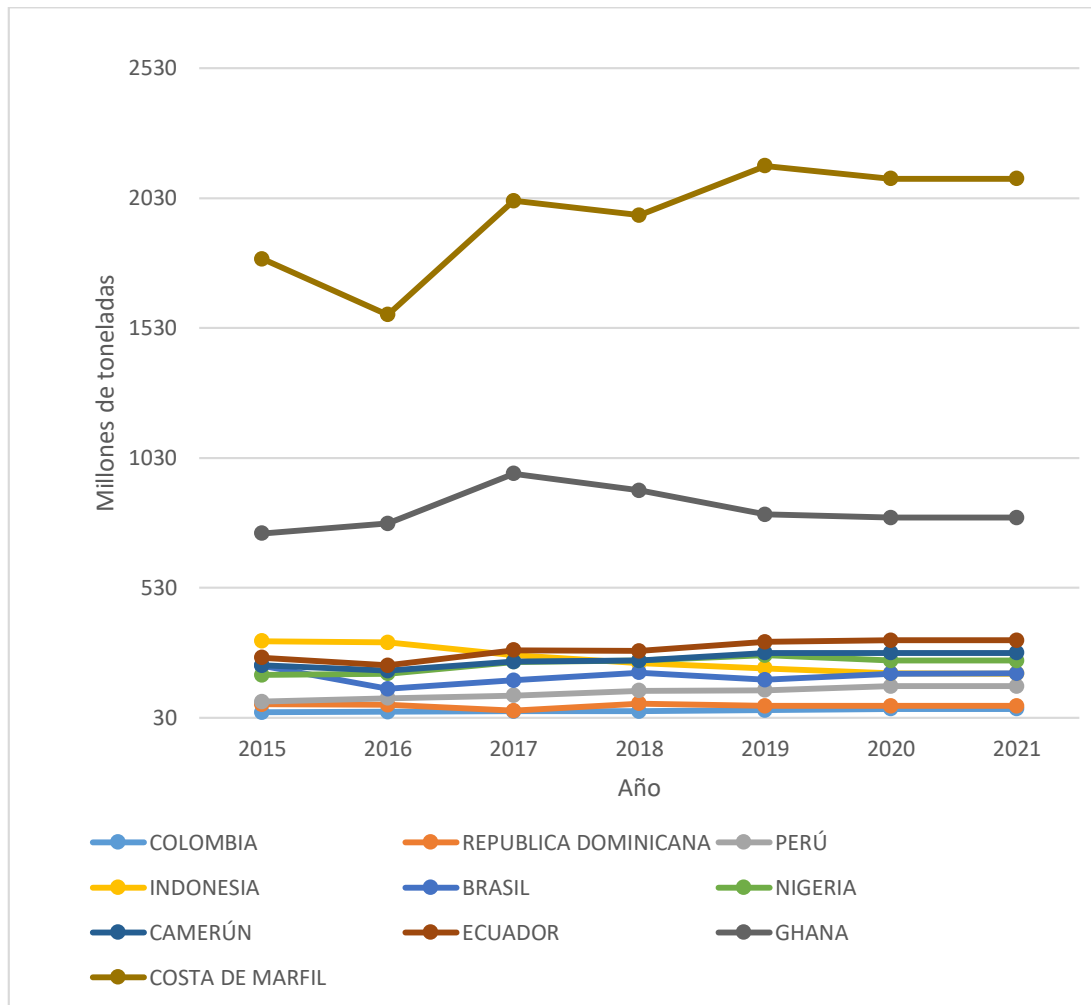
Países	Millones de Toneladas						
	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
Colombia	51	53	55	55	59	64	64
República Dominicana	82	80	57	85	75	75	75
Perú	92	105	115	134	136	151	151
Indonesia	325	320	270	240	220	201	200
Brasil	230	141	174	204	176	200	201
Nigeria	195	200	245	250	270	250	250
Camerún	232	211	246	250	280	280	280
Ecuador	261	232	290	287	322	328	328
Ghana	740	778	970	905	812	800	800
Costa De Marfil	1796	1581	2020	1964	2154	2105	2105
Total	4004	3701	4442	4374	4504	4454	4454

Nota: Producción de 10 países importantes para el año 2021, siendo el líder en la producción de cacao Costa de Marfil, tomado de (MIDAGRI, 2022).

las fluctuaciones de la producción de cacao desde el año 2015 hasta el 2021 lleva delante los países del África, como se muestra en la siguiente figura, dónde lidera Costa de Marfil, seguido por Ghana, etc.

Figura 5

Evolución de producción de cacao de los principales países productores desde el año 2015 hasta 2021



Nota: se muestra que la evolución en la producción anual de cacao de los principales países productores va constante sin crecimiento significativo con respecto a los últimos 3 años al 2022, pero se mantiene en producción mayoritaria los países Costa de Marfil y Ghana, siendo ambos países pertenecientes al continente africano, estos datos están basados en los datos de (MIDAGRI, 2022).

2.3.4 Demanda del Cacao en grano para molienda

Europa (35%), Asia, Oceanía (24%), África (21%) y América (20%) son los principales compradores de cacao en grano molido. Además, debido a la creciente demanda de productos de cacao por parte de los consumidores emergentes, se prevé que Asia y Oceanía sean las principales regiones de crecimiento. (MIDAGRI, 2022).

Se pronosticó que la molienda en las naciones productoras aumentaría más de un 3% en la temporada 2020-2021, o 63 mil toneladas, para alcanzar un total de 2 213 mil toneladas. En las naciones productoras, se prevé que se muele el 46% del cacao. Se prevé que superen las 620 mil toneladas en Costa de Marfil. Se prevé que Ghana supere las 300 mil toneladas (MIDAGRI, 2022). En la siguiente tabla mostramos los principales países demandantes de cacao en grano para molienda.

Tabla 4

Demanda de Cacao en grano para molienda por principales países

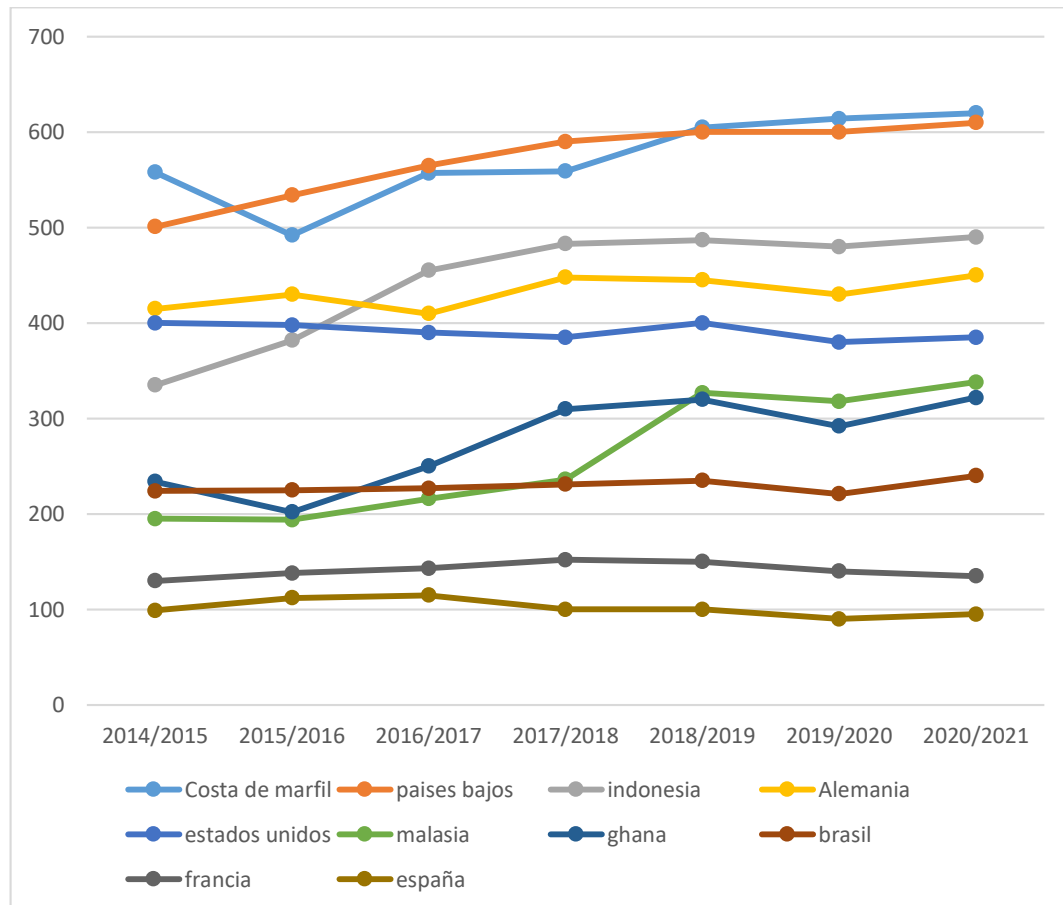
Países	Miles de Toneladas						
	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019	2019/2020	2020/2021
Costa De Marfil	558	492	557	559	605	614	620
Países Bajos	501	534	565	590	600	600	610
Indonesia	335	382	455	483	487	480	490
Alemania	415	430	410	448	445	430	450
Estados Unidos	400	398	390	385	400	380	385
Malasia	195	194	216	236	327	318	338
Ghana	234	202	250	310	320	292	322
Brasil	224	225	227	231	235	221	240
Francia	130	138	143	152	150	140	135
España	99	112	115	100	100	90	95
Subtotal	3091	3107	3328	3494	3669	3565	3685
Otros	1061	1021	1045	1091	962	1142	1226
Total	4152	4128	4373	4585	4631	4707	4911

Nota: Tomado de (MIDAGRI. 2022)

En la siguiente figura detallamos la línea de tiempo de los países demandantes de cacao en grano para molienda.

Figura 6

Evolución de los principales países demandantes de cacao en grano para Molienda en los últimos 6 años



Nota: Esta evolución es liderado por Costa de Marfil en los últimos 3 años, seguido por Países Bajos, fuente, (MIDAGRI, 2022).

2.3.5 Cacao Peruano

El cacao peruano se cultivó por primera vez en el siglo XVIII, cuando llegaron a la nación cultivares ecuatorianos, caribeños y centroamericanos. Los genotipos de cacao que se cultivan actualmente en Perú son híbridos y variedades tradicionales que se crearon utilizando germoplasma importado de los lugares anteriormente citados (Flores, 2015, 17). El Perú es uno de los principales lugares originarios del cacao con el 60% de los tipos de cacao del mundo, Perú es uno de los principales países productores de cacao. Por ello, Perú ha sido designado por la Organización Internacional del Cacao (ICCO) como nación productora y exportadora de cacao fino y de aroma, constituyendo el 36% de la producción mundial de este tipo de cacao (Sierra y selva exportadora, s.f.), este ha sido motivo para que las fábricas de Suiza, Bélgica y Francia, prefieran el cacao peruano fino y de aroma.

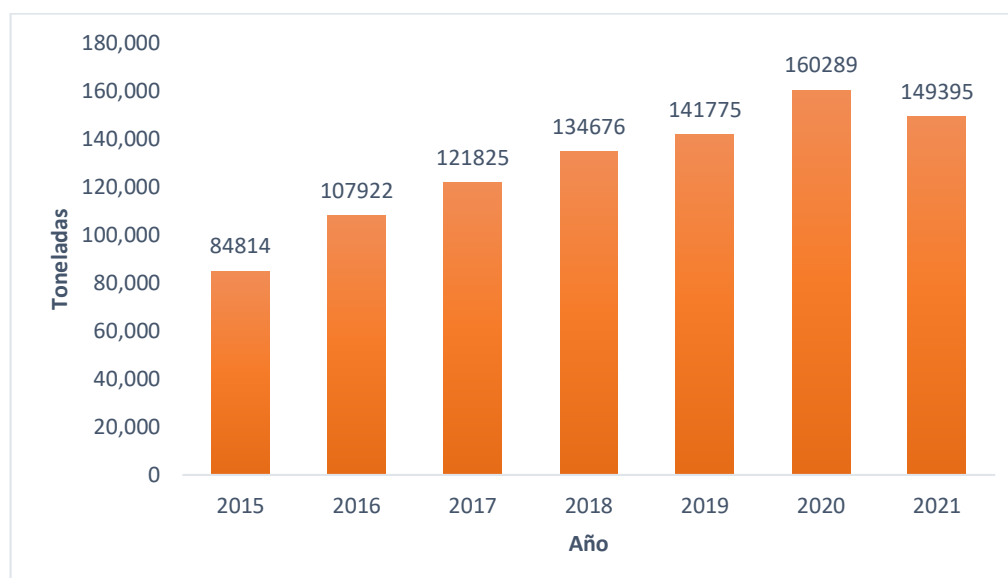
El cacao peruano se cultiva en la parte baja de la vertiente occidental de los andes, y en la selva peruana, entre los 300 y 900 m.s.n.m. siendo las principales regiones donde se cultiva este apreciado grano, Cusco, San Martín, Amazonas, Piura, Ayacucho y Junín que representan el 80% del total de la producción nacional. Los principales mercados de exportación son Estados Unidos y la Unión Europea (Holanda, Alemania, Bélgica e Italia) (Sierra y selva exportadora, s.f).

2.3.6 Situación del cacao a nivel nacional

Cada una de las tres agrupaciones genéticas que producen cacao en Perú incluye variedades endémicas: 53,3% Trinitario (Junín), 37,3% Forastero Amazónico (Cusco y Ayacucho) y 9,4% Criollo (norte de San Martín, Amazonas y Cajamarca). Las iniciativas de apoyo también han destacado el hecho de que la producción de cacao en grano del país ha crecido a una tasa media anual del 12,6% durante los últimos diez años (MINISTERIO DE DESARROLLO AGRARIO Y RIEGO, 2022, 11) el siguiente gráfico muestra el comportamiento de la producción de cacao a nivel nacional. La producción de cacao se incrementó a lo largo de los años, alcanzando su punto máximo en el 2020; sin embargo, en el 2021, la producción disminuyó como consecuencia de la caída de la producción de cacao en las regiones de San Martín, Ucayali y Amazonas.

Figura 7

Comportamiento de la producción nacional de cacao en grano en los últimos 5 años



Nota: se muestra en la figura que la producción nacional anual del cacao estuvo con crecimiento sostenido hasta el año 2021, los datos están basados en (MINISTERIO DE DESARROLLO AGRARIO Y RIEGO, 2022, 11)

San Martín produjo 57,1 mil toneladas (38%), seguido de Junín con 28,7 mil toneladas (19%), Ucayali con 20,8 mil toneladas (14%), Huánuco con 17,7 mil toneladas (10%), Cusco y Ayacucho con 6,6 mil y 6,2 mil toneladas, respectivamente. Estas regiones concentraron la mayor parte de la producción total de cacao de enero a noviembre de 2021. Aproximadamente el 90% de la producción nacional total de cacao en grano se concentra en estas seis regiones (MINISTERIO DE DESARROLLO AGRARIO Y RIEGO, 2022, 12). en la siguiente figura mostramos la producción regional de cacao en grano en los últimos 5 años.

Figura 8

Producción regional de cacao en grano

DPTOS	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021
PERÚ	84813	107920	121824	134675	141777	161133	149395
San Martín	37319	45996	51440	56136	54184	68428	57112
Junín	15334	21400	21801	24755	25560	27536	28670
Ucayali	4201	8622	13245	16587	17031	21705	20829
Huánuco	5292	6491	8912	10392	13403	14395	14746
Cusco	8048	10788	8707	8192	9915	7420	6576
Ayacucho	4973	5544	5056	5113	5998	5634	6160
Pasco	1144	1338	1835	3881	4407	4033	4597
Amazonas	4718	4224	6352	4514	5108	4772	4081
Piura	768	658	599	1009	1438	1385	1540
Cajamarca	1320	1001	996	955	1121	1150	1286
Otros dptos	1696	1858	2881	3141	3612	4675	3798

Nota: Extraído de los datos de (MINISTERIO DE DESARROLLO AGRARIO Y RIEGO, 2022, 12).

La productividad se mide en kilogramos de granos secos por hectárea de cacao cultivada. Según el método de cultivo, los rendimientos habituales de un cultivo comercial pueden oscilar entre 100 y más de 3000 kg/ha (Flores, 2015, 18). En la siguiente figura mostramos las principales regiones productoras de cacao, siendo de contraste más oscuro de mayor producción liderado por San Martín, Junín, como se menciona en la figura anterior.

Figura 9

Principales regiones productoras de cacao en Perú

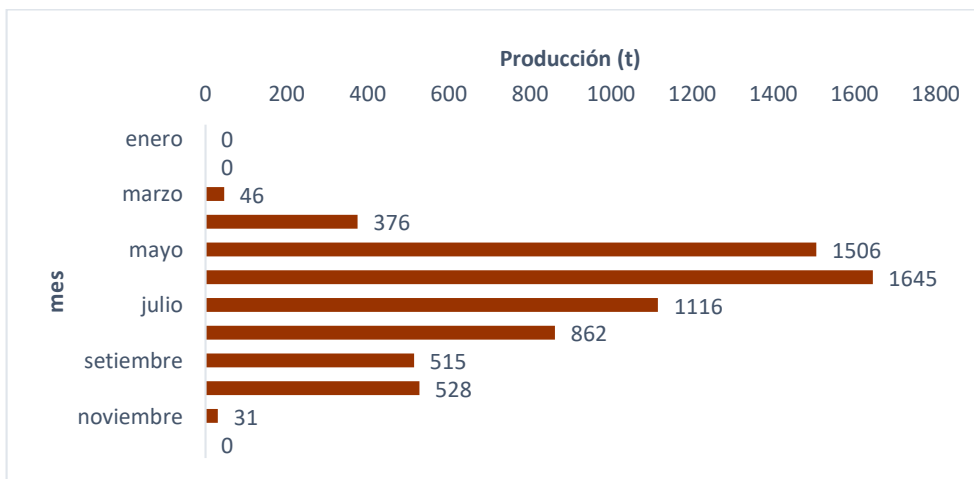


Nota: En la figura se muestra la intensidad del tono de color verde como indicado de cantidad de producción por región, basado en datos extraídos de (SIEA MIDAGRI, 2022)

En la región Ayacucho la producción de cacao ocupa el segundo lugar con un valor bruto de producción de 7.3%, en producción anual estimada de 6 625 toneladas, con rendimiento de 4.71 t/Ha, siendo 7656 productores identificados, el precio promedio chacra del cacao es de S/7.31 por cada kilogramo, la mayor producción es en el mes de Junio, mientras que los meses, enero, febrero y diciembre no hay producción, debido al ciclo biológico de la planta misma, en la siguiente figura se muestra la producción de enero-diciembre (SIEA MIDAGRI, 2022).

Figura 10

Producción de cacao de enero-diciembre, en la región Ayacucho



Nota: En la figura se muestra la producción anual de cacao en la región Ayacucho durante el año 2022, basado en los datos de. (SIEA MIDAGRI, 2022).

2.4 POST COSECHA DEL CACAO

2.4.1 Quiebre de mazorcas

El paso que empieza por determinar cuál de las mazorcas de cacao maduras hay que retirar viene indicado por el color del fruto, que varía en función de la variedad de cacao. El método consiste en separar las mazorcas libres de enfermedades de las sanas realizar el quiebre con un machete (Flores, 2015, 23).

2.4.2 Extracción de semillas

Con machetes o mazos romos, partir las mazorcas recogidas y realizar un corte en la mazorca para extraer las semillas de cacao. Elegir las semillas; para sacar las almendras sanas, utilizar dos o más recipientes; no mezclarlas con ningún contaminante (como placenta, fragmentos de cáscara o semillas no sanas). Las habas enfermas y germinadas estaban en otro recipiente (C.A.C Pangoa Ltda., 2016, 23).

2.4.3 Drenaje de mucílago

Esta operación se realiza con la finalidad de mejorar el proceso de fermentación, eliminar el exceso de humedad y evitar la fermentación láctica. El drenaje se realiza en tiempo de 5 a 6 horas, poniendo sobre la tarima los costales con granos frescos, en planta con fermentadores, el drenaje se realiza con canaletas conectadas con las cajas de fermentación (Saavedra, 2021)

2.4.3 Fermentación

La norma técnica peruana define como, “proceso bioquímico cuyo objetivo es lograr la muerte del embrión, produciendo el hinchamiento del grano y eliminación del mucílago(pulpa), desencadenando profundas modificaciones en su composición física y química, que inducen al desarrollo de los precursores del aroma y sabor a chocolate” ((Instituto Nacional de Calidad, 2017, 9). La pulpa mucilaginosa que recubre el cacao fresco representa el 40% del grano húmedo, es rica en azúcares como, glucosa, fructosa, sacarosa, ácido cítrico y minerales, que mantienen un pH de 3.3 a 4. Siendo este medio ideal para el crecimiento de levaduras y bacterias ácido lácticas. El grano está constituido de células blancas de grasa, proteína y células púrpuras de polifenoles (Nielsen et al., 2012, 39-42)

La fermentación de los granos ocurre en dos etapas, siendo la primera una fase anaerobia que dura 48 horas, en esta fase las levaduras fermentan los azúcares a etanol

y CO₂, también algunas levaduras producen compuestos volátiles y ácidos orgánicos, ácido acético, oxálico, fosfórico, succínico y málico que tienen capacidad amortiguadora a cambios de pH, cabe destacar que por la despolimerización de la pectina a causa de las enzimas el pH baja y se consigue el crecimiento de bacterias, ácido lácticas, que convierten azúcares a ácido cítrico para luego consumir este ácido y los otros ácidos mencionados (Flores, 2015, 13).

La segunda fase es aerobia, predominante con bacterias ácido acéticas que oxidan exotérmicamente al etanol en ácido acético, produciendo un incremento de temperatura de los granos hasta las 50°C. Por consiguiente, la temperatura y el pH promueven la muerte del grano, en esta etapa ocurren varios hidrólisis catalíticas por enzimas externas, las invertasas hidrolizan sacarosa, glicosiladas hidrolizan las antocianinas a antocianidinas, proteasas hidrolizan proteínas en péptidos hidrofóbicos y las polifenol oxidasas hidrolizan flavonoides en quinonas (Ardhana & Fleet, 2003, 90). Si los granos de cacao registran un pH alto 5,5- 5,8 estos son considerados mal fermentados, mientras que un pH bajo, 4,8-5,2. Después de la fermentación y secado los granos forasteros se caracterizan por presentar un pH alto comparado con granos criollos. El tiempo de fermentación varía de acuerdo a la variedad del grano, criollo 2-4 días y para variedad forastero de 4 a 7 días, mientras más oscura(violeta) sean las almendras de cacao, caso de los granos forastero, requerirá para fermentar (Camu et al., 2008, 2289). Este varía de acuerdo al país y el agricultor, en Perú se usa la técnica de fermentación en cajas madera pueden contener entre uno tonelada y dos toneladas de granos, su diseño incluye agujeros usualmente en la base con el objeto de permitir el drenaje de las sustancias, los granos son movidos con frecuencia, para incrementar la aireación y uniformizar la temperatura de los granos, también para evitar la formación (Flores, 2015, 13).

Figura 11

Cacao fermentado



Nota: El cacao fermentado tiene un color marrón claro y un aroma característico a fermentado, tomado de (Sirichai, 2022)

a) En la siguiente tabla se muestra las características comparativas de cacao fermentado

Tabla 5

Comparación de semillas de cacao fermentado

Almendras bien fermentadas	Almendras mal fermentadas
Hinchada forma redondeada	Almendras aplanadas
Fácil de aislar la cáscara de la almendra	Difícil de separar cascara de almendra
Color marrón chocolate	Compacta
Sabor medianamente amargo	Coloración violeta, púrpura, pizarrosa
Sabor a chocolate	Sabor amargo y astringente
	Sin sabor a chocolate

Nota: Según lo descrito por (C.A.C Pangoa Ltda., 2016,27)

b) defectos por fermentación inadecuada

- **Ausencia de fermentación**
Granos pizarrosos, sin aroma, astringente y amargo
- **Breve fermentación**
Granos violetas, poco aroma, amargo y astringente
- **Prolongada fermentación**
Granos sobre fermentados, sabores indeseables (Saavedra, 2021)

c) Pruebas de corte de cacao fermentado

Método utilizado para exponer los cotiledones de las habas de cacao con el fin de comprobar si hay contaminación en una muestra y averiguar con qué frecuencia se producen defectos o habas pizarrosas, violetas o moradas (Instituto Nacional de Calidad, 2018, 3)

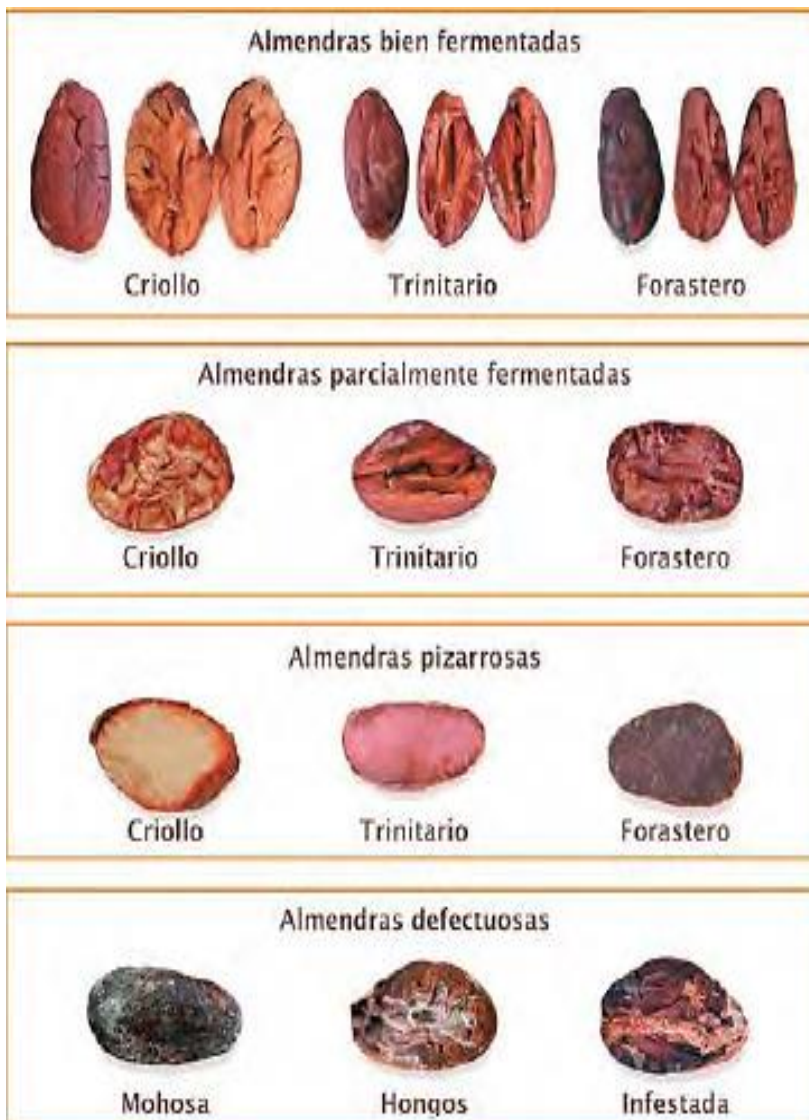
Tabla 6 Descripción de los granos fermentados

Color/descripción	Característica de calidad
Almendra de color marrón Cuando posee fermentación completa, estas almendras se separan fácilmente de la testa, tienen surcos definidos.	El sabor del grano es óptimo para elaborar chocolates finos
Almendra marrón rojizo Indican fermentación parcial, no se ha logrado elevar la temperatura mayor a los 47°C, testa algo suelta.	Su sabor regular pero aprovechable para producir chocolate.
Almendra violeta Son de una fermentación incompleta o enfriamiento, la apariencia interna es casi compacta, con pocas grietas, también puede ser por cosecha de fruto inmaduro.	Escaso aroma, con sabor amargo, astringente y ácido
Almendra pizarrosa Presentan un aspecto compacto, color gris o violeta, sin presencia de surcos o grietas	Ausencia de sabor y aroma, astringente y amargo.

Nota: la clasificación de color se realiza principalmente debido a que es una característica sensorial de calidad en los chocolates y pasta de cacao, en cuanto a la fermentación influye principalmente a la evaluación sensorial en los toques de aroma que surge durante la fermentación para posteriormente manifestarse en el producto final, siendo también un indicador de la calidad del grano de cacao, de acuerdo a lo descrito para prueba de corte, tomado de (C.A.C Pangoa Ltda., 2016, 27)

Figura 12

prueba de corte de cacao



Nota: La prueba de corte se realiza con un instrumento llamado guillotina, donde se introducen los 50 granos a muestrear, tomado del lote que compone la materia prima, para clasificación según el aspecto sensorial de color y aspecto físico fue tomado de (Organización Internacional del Cacao, 2017) organización que componen todos los países productores de cacao.

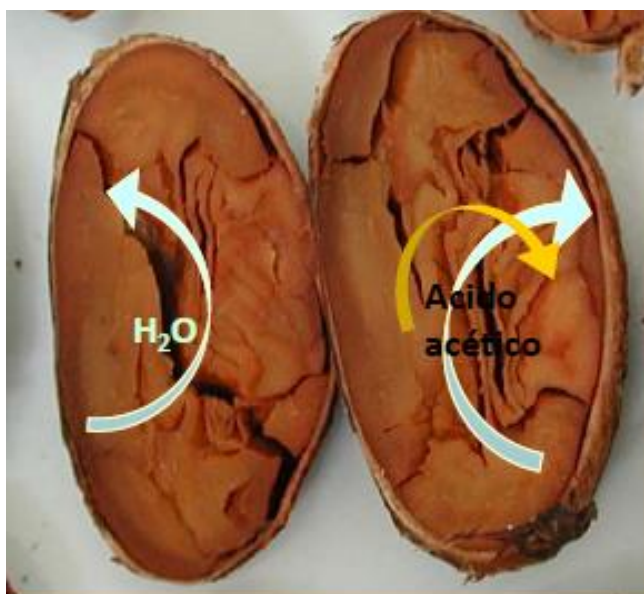
2.4.4 Secado

El proceso de secado debe alcanzar un contenido de humedad del grano tan bajo como sea posible; al final de la fermentación se tiene un contenido de humedad de los granos de cacao de alrededor del 55%, para ser almacenados con seguridad se debe reducir a

un límite no mayor a 7 % de humedad final del grano (Instituto Nacional de Calidad, 2017, 17). En esta etapa se completan los cambios bioquímicos que suceden en la fermentación, reduciéndose la acidez y el amargor, obteniéndose un característico sabor y aroma a chocolate. Se recomienda un proceso lento de secado en los dos primeros días concluida la fermentación (C.A.C Pangoa Ltda., 2016). Es importante recordar que este proceso requiere tiempo, ya que el secado es progresivo. Si la almendra se seca muy rápido el interior quedará húmedo y con mayor acidez de lo normal (Instituto Nacional de Calidad, 2017, 18).

Figura 13

Secado de los granos de cacao



Nota: En el proceso de secado se expulsa agua y ácido acético del interior de la almendra así reduciendo su acidez, el secado debe realizarse con constante movimiento, para que el proceso descrito en la imagen se realice de manera uniforme, tomado de (Saavedra, 2021, 21).

e.1 Cuidados durante el proceso de secado

- Secar los granos sobre tarimas de madera.
- El primer día de secado será de dos a cuatro horas al sol, en cama mínimo de cinco centímetros de espesor (4 dedos)
- Segundo día 4 horas al sol, se debe pasar con rastrillo para voltear cada hora
- Tercer día en adelante secar al sol corrido y pasar con rastrillo cada hora
- Si se usa secado artificial no pasar los 50°C de temperatura (Saavedra, 2021).

e.2 Requisitos de calidad de los granos de cacao

Tabla 7

Requisitos de calidad de cacao en grano seco

Requisitos		Descripción			
Tamaño de los granos (número de granos en 100g)	materia extraña	no debe exceder el 0.75% de la muestra de referencia			
	humedad	al momento de carga de país productor no debe exceder el 8%, pero no debe exceder el 7.5% al momento de descarga en el país comprador			
	otras características	los granos de cacao deben estar: razonablemente libre de granos germinados uniforme en tamaño y color aptos para producción de productos alimenticios			
	Granos de tamaño estándar	recuento de granos menor igual a 100			
	granos de tamaño mediano	recuento de granos de 101 al 110			
Determinación del grado	Granos de tamaño pequeño	recuento de granos de 111 a 120			
	granos de tamaño muy pequeño	recuento de granos superior a 120			
		Grado	porcentaje (%) de granos		
			mohoso	Pizarroso	dañado por insectos
	clasificación para granos	grado 1	3	3	3
	fermentados	grado 2	4	8	6

Nota: Los porcentajes mostrados con los máximos, los granos planos no deben exceder del 1.5% de muestra de referencia, Según la norma técnica peruana, tomado de (Instituto Nacional de Calidad, 2018, 8-11).

2.5 Procesamiento del cacao

2.5.1 Recepción de materia prima

Esta operación consiste en seleccionar la muestra de cada costal, para medir la humedad y realizar el análisis sensorial, medir la masa, almacenar el cacao que cumple con los requisitos establecidos según los estándares establecidos por la industria o normas técnicas (Cortez, 2018) .

Análisis Físico

Color: marrón claro a oscuro.

Olor: libre de olores extraños.

Calibre: 100 granos / 100 gramos, grano uniforme.

% de fermentación (Saavedra, 2021).

Análisis de la muestra

1. Se extrae 1000 g. por cada saco se homogeniza, se cuarteo.
2. Se utiliza una muestra de 100 g para evaluar el contenido de humedad.
3. Para estimar un porcentaje o rendimiento, se separan las impurezas y los defectos y se pesan por separado.
4. Para hallar el calibre, se pesan tres muestras con un total de cien granos.
5. Se hace la prueba de corte para determinar: porcentaje (%) de fermentación (violetas, blancos, pizarrosos), mohos, atacados por insectos (Saavedra, 2021).

En cuanto al contenido de metales pesados, en nuestro país no se encuentra establecido un límite de metales pesados en caso de productos derivados del cacao, en cambio se acomoda de acuerdo al país al que se va vender o el mayor valor de las normas internacionales existentes, en caso del Codex alimentarius no establece un límite en cuanto al plomo y cadmio para derivados de cacao, el método que se usa para la determinación de plomo y cadmio en esta investigación es el AOAC 999.11, en la tabla 8 se detalla las normas de acuerdo al país en cuanto al plomo, cadmio (Saavedra, 2021).

Parámetros mínimos de calidad

- Rango de humedad: 7-8%.
- Fermentación completa: un mínimo del 80%.
- 14% es la fermentación media.
- Grano púrpura: no más del 10%.
- Pizarra granulada: no más del 2%.
- Moho de grano: 1%
- Otros: partidos, nacidos, dobles, hasta el 3%.

- Peso: 1,10 g, basado en (Instituto Nacional de Calidad, 2018)

Tabla 8

Límites de metales pesados (cadmio, plomo) en las regulaciones internacionales

País o Ciudad	Plomo (Pb)	Cadmio (Cd)
EEUU		0,05-0,12mg/kg
China		0,1mg/kg
México	0,1-1mg/kg	
Unión Europea		0,8mg/kg (*)
Austria y Nueva Zelanda		0,5mg/kg
Brasil	0,5-2mg/kg	
Chile	2mg/kg	15mg/kg
Argentina		0,3mg/kg(**)
Ecuador	1mg/kg	
Venezuela	0,5mg/kg	
Guatemala	1mg/kg	
Corea Del Sur	2mg/kg	
Sudáfrica	1mg/kg	
Uruguay		0,2mg/kg

Nota: Se describe los límites de metales pesados (Cd y Pb) cadmio y plomo en los diferentes países (*) para chocolate cuyo contenido de cacao >50%, (**) para chocolate cuyo contenido de cacao >40%, basado en (Jimenez, 2015)

2.5.2 Selección y limpieza de granos

Cosiste en la separación de las impurezas existentes, para obtener granos de cacao limpios

2.5.3 Tostado

Es una operación unitaria, dónde se expone el grano de cacao al calor por cierto tiempo y temperatura, con la finalidad de desarrollar los caracteres sensoriales y, por consiguiente, se reduce la humedad (Instituto Nacional de Calidad, 2017,14), también debemos mencionar que en el proceso de obtención de chocolate este es el único

proceso que presenta el punto crítico de control, donde el producto si se tuesta de manera incorrecta no tendremos un buen producto final.

Saavedra, (2021) menciona que el proceso de tostado va dependiendo de la variedad del grano de cacao y se lleva a cabo a una temperatura entre 120 - 140 °C, durante 15-30 minutos. El proceso de tostado suele facilitar la separación del grano de la cáscara. Esto facilita el proceso de rotura de la cáscara y descascarillado. Sin embargo, al incorporar granos de cacao de distintos tamaños. La manteca de cacao se funde al calentarse. Así, una parte de ella queda suficientemente libre para pasar a la cáscara, donde permanece y se elimina durante el procedimiento de descascarillado. Se cree que con este método se pierde un 0,5% de la manteca de cacao. Además, el grano necesita más energía para calentarse a través de su cáscara. La cáscara pierde toda la energía utilizada para calentarla. Se cree que se necesita hasta un 44% más de energía que con otros métodos de tostado (Beckett, 2002, 54). El nivel de humedad del cacao desciende a menos del 3%, al tostar a una temperatura de 110 a 140°C. Se tarda entre 45 minutos y una hora en tostarlo. La pasta de cacao se convertirá en una masa espesa en lugar de líquida si el contenido de humedad es demasiado alto. Una concentración de humedad del 10% daría lugar a una sustancia casi sólida que sería extremadamente difícil de moler porque incluso cantidades ínfimas de agua reaccionan fuertemente con este sistema celulosa-proteína-grasa (Beckett, 2002, 56). Mientras (Schuhmacher et al., 1998, 37) mencionan que, en la fase inicial del tostado, es en la que los granos pierden un 3% de agua y la cáscara se afloja, para su posterior separación del núcleo, luego viene la fase para el desarrollo del aroma, siendo diferente las temperaturas de acuerdo a la variedad, en los cacaos provenientes del África sitúan entre 120 y 130°C, en tanto que para el cacao fino debe ser menor a 120°C

En el proceso de tostado se volatilizan principalmente el ácido acético, que también (Beckett, 2002) se elimina en el proceso de secado, pero también hay otros ácidos, como oxálico y láctico que permanecen iguales incluso después del tostado. La principal reacción que se produce es la reacción de maillard, donde la glucosa presente en el grano se rompe en cadenas de C1, C2, etc., la reacción de Stricker también se produce con precursores intermedios, que son moléculas con dos grupos carbonilo que se unen a la glicina, la treonina, la leucina y la glutamina, importantes para adquirir el color y aroma. Estos precursores incluyen la 1-, 3- y 4-desoxihexulosa, respectivamente, que implica la formación de los sabores, debido a que es una formación de aldehídos que forma parte del favor del chocolate (Beckett, 2002),

2.5.4 Molturación del Nibs de Cacao

Los granos de cacao se procesan varias veces hasta que quedan finamente molidos. A continuación, la presión y la fricción se combinan para crear un material de textura suave y espesor líquido que se denomina pasta de cacao y se utiliza para fabricar chocolate o cacao en polvo (Saavedra, 2021). Unas partículas ligeramente más pequeñas son el primer objetivo de la molienda del cacao; el segundo es extraer la mayor cantidad posible de grasa del interior de las células. La grasa se encuentra en células que suelen tener entre 20 y 30 micras (μm) de longitud y entre 5 y 10 micras de anchura/profundidad; esta grasa envolverá la parte no grasa del chocolate, formando una pasta fluida. En esta etapa la molienda no es muy fina, debido a que para la fabricación de chocolate habrá otra molienda más fina, es necesario moler hasta menores de 30 micras, en algunos molinos, esto se puede obtener pasando varias veces por el molino (Beckett, 2002, 62).

2.5.5 Pasta de Cacao

Como se indica en la NTP. Codex 141. El producto conocido como pasta de cacao o licor de cacao se elabora a partir de granos de cacao de calidad comercializable que cumplen unas normas mínimas de calidad. Los granos se han limpiado y liberado de la cáscara tan a fondo como ha sido técnicamente posible, sin añadir ni eliminar ninguno de sus componentes (Instituto Nacional de Calidad, 2017, 1).

2.6 PROCESAMIENTO DEL CHOCOLATE

2.6.1 Insumos

A) Manteca de cacao

“Grasa derivada del cacao que presenta las siguientes propiedades Contenido de ácidos grasos libres (representados por el ácido oleico) superior al 1,75% p/p Materia no apta, no superior al 0,7% p/p, con excepción de la manteca de cacao prensada, que no puede superar el 0,35% m/m” (Instituto Nacional de Calidad, 2017, 14).

2.6.1.1 Xilitol

El xilitol es un alcohol de azúcar natural de fórmula $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$, tiene un punto de fusión de 92-96°C, es tan dulce y volumétrico como el azúcar sacarosa y no previene por sí solo las caries dentales. Cuando se consume en forma de gránulos, se siente fresco al tacto

y puede utilizarse en las mismas recetas que el azúcar normal, excepto en las que requieren la adición de azúcar para activar la levadura (California Dental Association, s.f). en la figura siguiente se muestra las características del xilitol también la sustitución de azúcar (sacarosa)

La tolerancia al xilitol en una dieta adaptativa puede ser de 20g al día en una sola comida, hasta 60g/día en diferentes momentos de la dieta humana, además que el cuerpo humano produce xilitol como producto del metabolismo de carbohidratos (Culbert, y otros, 1986), aunque en un suplemento de 10% de xilitol disminuyó la desorción ósea en ratas con deficiencia de calcio, cuando ese tratamiento se ejecutó 10g/kg dieta (Mäkinen, 2000)

Tabla 9

Descripción del Xilitol

Alcohol azúcar	Nomenclatura	Valor nutritivo	poder edulcorante relativo a sacarosa	Cantidad mínima tolerable sin sintomatología gastrointestinal (g/día)	presencia	IG
Xilitol	E967	2,4	1	20-60	Chicles, mentas para aliento	1 2

Nota: El xilitol puede tener efectos gastrointestinales provocando diarreas, se muestra la cantidad mínima tolerable, IG: Menciona el índice glucémico que tiene el Xilitol después de consumo. En cuanto a la toxicidad del xilitol se estudió en ratas siendo la LD50 oral de 22g/kg de peso corporal, lo que es seguro, basado en (García, Gracia, Casado, & García, 2013),

2.6.2 Mezclado

En esta etapa lo que se busca es integrar los ingredientes principales (licor, azúcar, leche, etc.) (Saavedra, 2021). Según el tipo de formulación que se vaya elegir, se mezclará, licor de cacao, manteca de cacao, azúcar, nata o leche en polvo; especias correctoras del sabor como la vainilla, café, canela, avellanas, almendras, y otros componentes sólidos. Según sea el tipo de empresa se usa pasta de cacao de un solo tipo de cacao o mezcla de varios tipos (Schuhmacher et al., 1998, 44).

2.6.3 Refinado

Proceso que genera la reducción de tamaño pulverizando, con una dimensión de 17 micras. Las cuales son más pequeñas que las papilas gustativas (JOHFREJ C&V Chocolates, 2022). Los diversos componentes se unen en una mezcla de refinación a una temperatura de 40-50°C, donde se reducen las partículas de 0.2 mm de diámetro hasta 0.02 mm equivalente a 20 μ (micras), este en un tamaño donde la lengua ya no percibe como partícula, lográndose la untuosidad, que es el objetivo de este proceso (Schuhmacher et al., 1998, 45).

2.6.4 Conchado

Según la NTP 107.32. Es una operación unitaria, donde la pasta de chocolate es amasada a cierta velocidad, temperatura, tiempo. Con la finalidad de mejorar la sensación del sabor de sustancias no deseables en sabor del chocolate. Dependiendo del equipo a utilizar, puede contribuir a la reducción del tamaño de partícula y los parámetros reológicos (Instituto Nacional de Calidad, 2017). En la industria del chocolate uno de los parámetros más utilizados para predecir la calidad final de un chocolate está dado por el tiempo de conchado. Este tiempo puede ser entre 6 a 12 horas en promedio a una temperatura de 40-50°C, pero puede llegar a tardar incluso días dependiendo de la calidad a la que se quiera llegar (SAAVEDRA, 2021).

El conchado continúa cambiando el flavor del chocolate y también el modo en el que funde en la boca. de gran importancia para el fabricante de chocolate, determina la viscosidad final del chocolate líquido antes de que se utilice para fabricar el producto final (Beckett, 2002, 87). En este proceso se mejoran los principios amargos no deseables y una fina película de manteca de cacao se extiende sobre las partículas sólidas. Unas 14 horas después se logra una pasta más homogénea, antes de 3 horas que concluya el proceso se añade lecitina, para que el chocolate pueda verterse con más fluidez en moldes (Schuhmacher et al., 1998, 45)

2.6.5 Temperado

Durante el proceso de elaboración del chocolate, se aplica un régimen de temperatura especializado en una operación unitaria para garantizar la construcción de un cristal graso estable. La NTP 107.32 establece que la forma depende de la curva de enfriamiento se utiliza para determinar el grado o grado de atemperado (Instituto

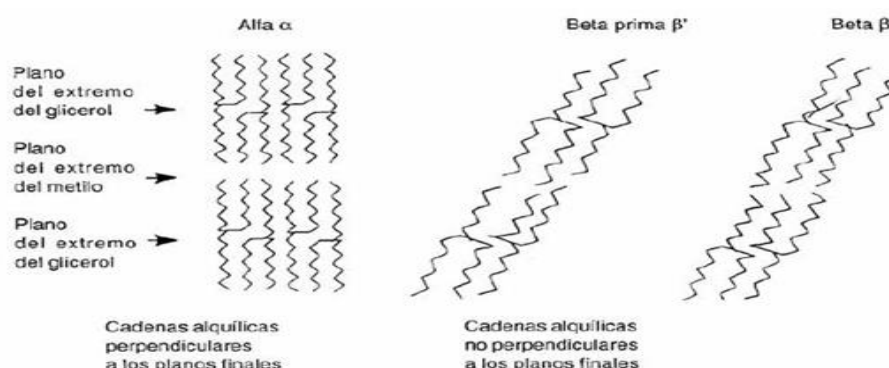
Nacional de Calidad, 2017, 9). Consiste en la reducción de la temperatura del chocolate que en el conchado alcanzó entre 50 °C, garantizando la cristalización de una cantidad mínima de manteca en cristales del tipo estable, aproximadamente el 1%, mientras que los cristales del tipo inestable están listos para ser moldeados. Cuando se calienta no debe sobrepasar los 50 °C, para volver a darle fluidez, para evitar que se funda la grasa cristalizada (Saavedra, 2021).

En el caso que la pasta de cacao tiene una temperatura de 45° a 55°C. Se requiere una etapa más para darle su acabado sedoso; primero, debe enfriarse a 28°C y, a continuación, calentarse a 32°C una vez más. Además del brillo y la suavidad del chocolate, esta técnica estabiliza los cristales de grasa, lo que permite una rotura crujiente. Durante este procedimiento es necesario cizallar la superficie de las partículas, y puede hacerse en materiales como el granito, mesas de mármol o máquinas de templado entrenadas para cizallar fuerzas con el fin de producir la curva de templado (Schuhmacher et al., 1998, 47).

La característica de las grasas que les permite cristalizar de múltiples formas se denomina polimorfismo. La estructura se hace más resistente y difícil de fundir a medida que se hace más densa y requiere menos energía. La estructura y configuración de las cadenas polimórficas que contienen los ácidos grasos de la manteca de cacao se representan en la siguiente imagen (Beckett, 2002, 101).

Figura 14

Proyección que muestra la disposición de las cadenas alquílicas de los polimorfismos α , β , β' .

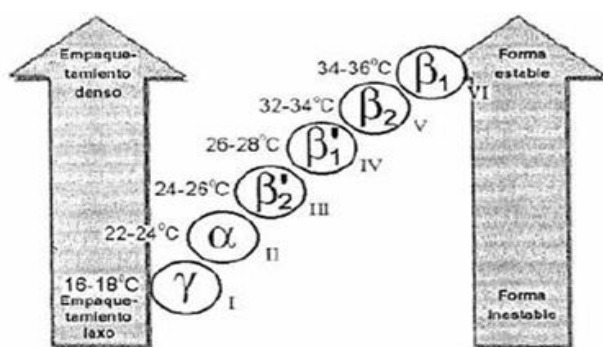


Nota: Se muestra que existen tres diferentes tipos de cadenas con disposiciones, que éstas a su vez tengan que encajar para cristalizar de la forma deseada en el chocolate, tomado de (Beckett, 2002, 101).

La razón de esto es que las diferentes moléculas de grasa, pueden encajar entre sí de varios modos diferentes. El ángulo en el que encajan y el ángulo de inclinación determina su estabilidad. Algunas grasas sólo tienen una forma estable mientras que otras tienen tres, las α β β' . Sin embargo, la manteca de cacao tiene seis formas suele numerar del I al VI en la industria del chocolate, tal y como fueron descritas por (Beckett, 2002).

Figura 15

rangos de temperaturas a los que pueden desarrollarse de forma estable las seis formas cristalinas.



Nota: Se muestra en la figura las formas de cristales a diferentes temperaturas, tomado de (Beckett, 2002, 102)

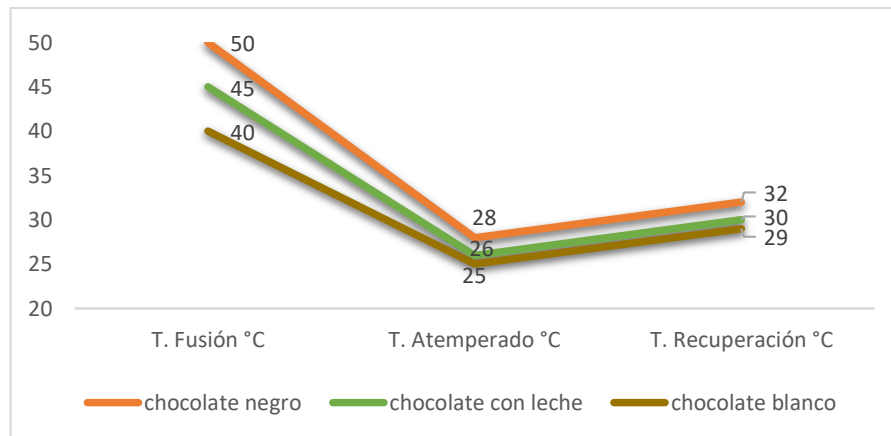
La figura 15 muestra los intervalos de temperatura de las distintas formas de grasas al cristalizarse. Las formas V y VI son las más estables de tres cadenas; las demás formas son de longitud de dos cadenas, la forma gamma(I) se funde a unos 17°C y es extremadamente inestable; evoluciona rápidamente a la forma II, que luego pasa por etapas más lentas de transformación para convertirse en las formas III y IV, la forma IV es relativamente blanda, por lo que el chocolate no producirá ningún chasquido al romper. Además, en pocos días, pasará a la forma III. Por ello Para elaborar productos de confitería, las grasas de la manteca de cacao deben tener la forma V, se trata de una forma firme que genera un buen chasquido y da un aspecto brillante con una resistencia bastante satisfactoria al fat bloom. La forma VI es más estable, aunque en condiciones típicas sólo se crea mediante una transformación de sólido a sólido y no inmediatamente a partir de manteca de cacao líquida, esto significa que la grasa del chocolate en la forma V tras un período de meses, o a veces años, empezará a dar un fenómeno de fat bloom. Por consiguiente, en el proceso de temperado del chocolate debe alcanzar lo más rápidamente posible a la forma V las grasas de la manteca de cacao (Beckett, 2002, 103).

a) curva de atemperado

A continuación, se muestra la curva de atemperado del chocolate, de acuerdo a la variedad del chocolate..

Figura 16

Curva de temperado según tipo de chocolate



Nota: El chocolate negro o chocolate amargo, tomado de (Saavedra, 2021), T. Fusión: temperatura de fusión, T. Atemperado: temperatura de atemperado, T. Recuperación: Temperatura de recuperación

por tanto, es necesario cumplir con las curvas de temperado según el tipo de chocolate, como menciona (Saavedra, 2021), las formas de cristalización de la manteca de cacao:

Forma β : es estable hasta los 33° C, forma cristales grandes y estables, con buen brillo.

Forma β' : estable hasta 28-29 ° C. Forma α : estable en el entorno de los 23 ° como máximo.

Forma γ : Estable a 17 ° C. Es evidente que la forma β es la más deseable ya que permite que el chocolate soporte la manipulación (coger un bombón con la mano sin mancharse).

2.6.6 Moldeado

El chocolate es un fluido no newtoniano, así que no fluye por sí misma requiere movimientos adicionales para liberar las burbujas atrapadas en el interior, también para formar moldes deseados. Por ello es necesario el uso de vibradores o movimientos fuentes del molde con chocolate, en un vibrador se debe poner a más de 30 ciclos, para que las burbujas se eleven (Beckett, 2002).

2.6.7 Enfriado

El chocolate puesto en moldes se lleva al proceso de enfriado para obtener dureza y forma a temperaturas inferiores a 17°C pero mayores a 0°C para evitar la acumulación de hielo en la superficie del chocolate que puede ocasionar sugar Bloom.

2.6.8 Envasado y Almacenamiento

En el envasado de los chocolates se realizan, como envase primario bolsas trilaminadas (nylon/ adherente/ de polietileno de baja densidad), Papel aluminio. Como envase secundario de cartón corrugado (Guerrero et al., 2012).

2.7 NORMA TÉCNICA PARA EL CHOCOLATE

2.7.1 CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA EL CHOCOLATE

Los criterios microbiológicos son establecidos por el ente regulador Dirección General de Salud Ambiental e inocuidad Alimentaria (DIGESA) con la finalidad de salvaguardar la salud de la población peruana.

Tabla 10

Límites permisibles de microorganismos en chocolates.

Agente microbiano	categoría	clase	n	C	limite por g	
					m	M
Mohos(*)	5	3	5	2	10 ²	10 ³
Escherichia coli	6	3	5	1	3	10
Salmonella sp.	11	2	10(**)	0	ausencia/25 g	...
(*)Sólo en el caso de chocolates rellenos						
(**) Hacer composito para n=5						

Nota: De la resolución de para los criterios microbiológicos, tomado de (DIGESA, 2018)

2.8 ACEITE DE COPAIBA

La composición química del aceite de copaiba se encontró un total de 96,912% de ácidos grasos, presentando mayor proporción el Vaccenico con 18,112%, Elaídico con 16,031%, linoleico con 15,384%, palmítico con 13,967%, le sigue el 7,10-octadienoico

con 9,781% behénico con 6,317%, lignocérico con 6,460% y lo demás en menor proporción; en general se puede decir que presenta el 36,602% de ácidos grasos saturados y el 60,31% insaturados clasificados en monoinsaturados con el 34,143% y diinsaturados con el 26,167%. También se encontró un 2,2798% de otros compuestos entre ellos, el ácido araquídico y 11-eicosano en mayor proporción, también la vitamina E, el esqualeno y butil hidroxitolueno, estos tres últimos son empleados como aditivos, antioxidantes naturales en alimentos, en industrias cosméticas y farmacéuticas (Lafont, Páez, & Lans, 2011).

El aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*), se extrae de los árboles amazónicos a cuyo tronco se realiza un agujero en el cual se conecta un tubo, por el cual la aceite fluye, es de color traslucido ámbar muy parecido al aceite comercial (Amazón Andes, 2023), la composición de este aceite es principalmente de sesquiterpenos en un 90% en su composición, entre los principales el β -cariofileno, siendo el componente bioactivo de la mezcla (Pasquel, y otros, 2018), el aroma de β -cariofileno se caracteriza por ser picante, maderado, sabor a alcanfor, limón, clavo de olor (Collado, 2023)

Las contraindicaciones para la salud del aceite de copaiba, aún no se reportado de datos de búsqueda abiertos, pero cabe destacar que podemos estudiar los efectos secundarios de los componentes químicos antes mencionados

2.9 CAVIDAD BUCAL

2.9.1 Visión general del diente

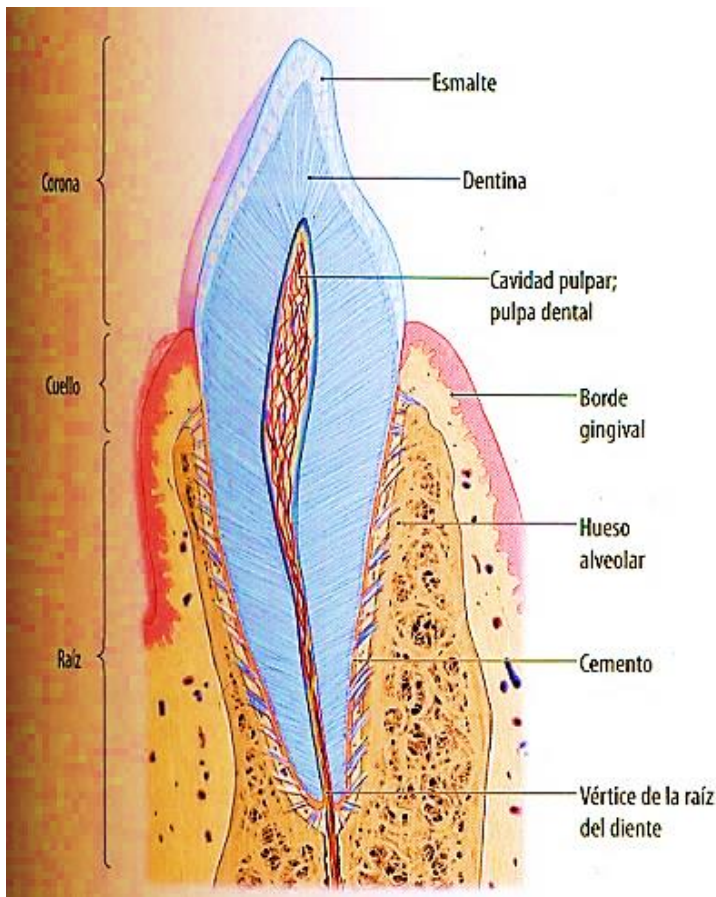
Los dientes son de vital importancia para la vida de los seres vivos que se alimentan a través de la masticación, la mayoría de los vertebrados tienen dos denticiones, a excepción de los roedores y elefantes cuyos dientes son de crecimiento continuo, al tener una dentición definitiva como los humanos algunos vertebrados están condicionados a morir por inanición. En caso de los humanos podemos vivir sin dientes gracias a la inteligencia, pero su ausencia determina la calidad de vida, siendo entonces un vínculo corporal importante (García & Hurlé, 2005).

El diente se divide en: Corona, cuello, raíz. El primer diente de leche en salir es a los seis meses de nacido, a los 6 años ya se completó el total de la dentición temporal que consta de 20 dientes. El primer diente permanente erupción entre 6-8 años y el último molar permanente (diente de juicio) entre los 16-30 años (Schüke, Schulte, Schumacher, Voll, & Wesker, 2007).

La **dentina** es el mayor componente del diente, cuya composición es de 70% de hidroxiapatita. **Esmalte**, el esmalte es la cubierta de la dentina, que está compuesto por fosfato de calcio y carbonato de calcio alrededor del 95% del peso seco. Esta capa de sales protege a los dientes de los ácidos y bacterias. **Cemento**, es la sustancia similar al hueso que cubre la raíz de la dentina (Tortora & Derrickson, 2018)

Figura 17

Histología del diente



Nota. Se muestra la composición histología y morfología del diente, (Schüke, Schulte, Schumacher, Voll, & Wesker, 2007)

2.9.2 Saliva

La saliva es una secreción de las glándulas situadas en la cavidad bucal, en promedio es secretada alrededor de 1000 mL-1500mL, aunque esto en un valor variable de acuerdo al consumo de líquidos, entre sus componentes tiene, enzimas (amilasa salival, lipasa salival, lisozima), iones (cloruro, bicarbonato y fosfato), urea y ácido úrico, Inmunoglobulina A (IgA). La lisozima y la IgA, son componentes antibacterianos, pero

no se encuentra en cantidad suficiente para matar a todas las bacterias (Tortora & Derrickson, 2018).

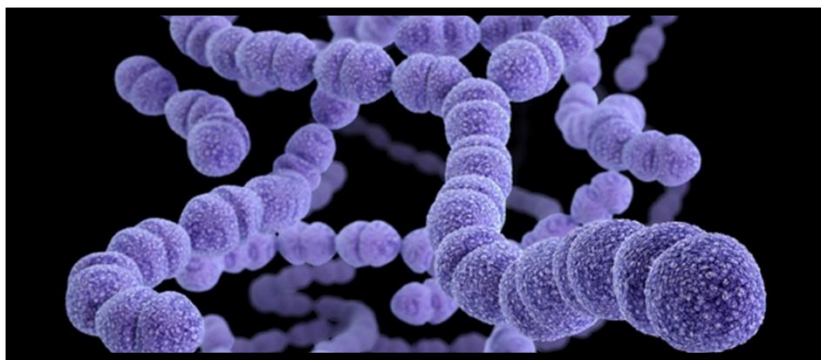
La saliva contiene un 99% de agua y 1% constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas, la saliva se divide en una porción serosa rica en ptialina(α -amilasa) secretada por las glándulas parótidas y una porción mucosa que contiene mucina, que cumple la función de hidratación y lubricación. Entre las moléculas orgánicas se tiene: aminoácidos, lípidos inmunoglobulina (IgA, IgG, IgM), proteínas ricas en serina, glicoproteínas, mucinas, histaminas, lactato, ácido úrico, urea, peroxidasa salival, anhidrasa carbónica; mientras que los componentes inorgánicos son: iones de calcio, fluoruros, fosfatos, tiocianato, hiotiocianato, yodo, cloro, bicarbonato, sodio, potasio, magnesio, amonio, de todos los iones mencionados, el más importante es el calcio (Aguirre & Vargas, 2012).

2.10 STREPTOCOCCUS MUTANS

Streptococcus mutans, es una bacteria gram positiva, que se encuentra en forma de coco, y bacilo, también se aglomera formando cadenas, puede ser transmitido por gotitas de saliva o también en contacto con superficies inertes, fuera de la cavidad bucal puede sobrevivir hasta 24 horas (Tanzer, Livingston, & Thompson, 2001).

Figura 18

Streptococcus mutans



Nota: Se muestra a la bacteria *Streptococcus mutans*, aglomerado en cadenas de cocos, tomado de (American Society of Microbiology, 2016)

Streptococcus mutans es uno de los microorganismos cariogénicos asociados a la caries dental. De acuerdo con la hipótesis de la placa ecológica, la caries dental es la consecuencia de cambios en el balance natural de la microflora de la placa dental causados por la alteración de las condiciones ambientales locales (homeostasis microbiana oral) (Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013)

Para el desarrollo de la caries dental existe una ventana de infección, es decir la infección está, pero aún no se desarrolla tampoco se puede detectar. En los primeros 19 a 31 meses los *S. Mutans* ingresa al infante mediante el contacto frecuente con personas cariogénas, siendo niños en guardería, madre, padre, familiares infectados con *S. Mutans*, una vez transferido las bacterias se establecen en las piezas temporales, para luego infectar a las piezas permanentes (Negroni, 2018).

2.11 CARIES

Es una enfermedad de los tejidos calcificados del diente provocada por ácidos que resultan de la acción de microorganismos sobre los hidratos de carbono, puede haber factores como los grupos enzimáticos, azúcares, lactobacilo, placa adherente y solubilidad del esmalte dental (Barrancos & Barrancos, 2006).

El postulado de Fejerskow (2004) menciona que la caries dental es una enfermedad infecciosa, no clásica, transmisible y multifactorial. Entre los factores implicados son el factor cultural, biológico, y socioeconómico. Estos factores interactúan de manera directa e indirecta para el desarrollo de los microorganismos cariogénos, esto en consecuencia, produce un cambio en la ecología de la biopelícula bucal. Finalmente, la enfermedad de caries es producida por el desequilibrio mineral de las piezas dentarias y los constituyentes de la biopelícula (Negroni, 2018).

El postulado de Negroni, menciona que los factores socioeconómicos, culturales y estilo de vida, son condicionantes para el hábito dietético, higiene bucal (frecuencia, tipo y cuidado odontológico), también podría estar implícito el factor genético, como la, formación del esmalte, dentina, composición del fluido salival, consumo de drogas y exposición a los algunos sedantes que producen la baja función de las glándulas salivales (Negroni, 2018).

La caries es causada por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas que dejan su estado libre de flotación para formar una biopelícula donde se adhieren irreversiblemente al sustrato, y otras encerradas en matriz de polímeros. Esto favorece su estado patógeno acidificas y acidogénicas (Negroni, 2018).

Si se controla a la mujer embarazada, al personal de la guardería y otros niños del entorno, se podría retardar la aparición de caries. Según el estudio de "Caufield y Cols, demostraron que el momento de mayor riesgo es entre los 1,5-2,5 años de edad, después de los 2 a 5 años de edad las posibilidades son bajas" (Negroni, 2018).

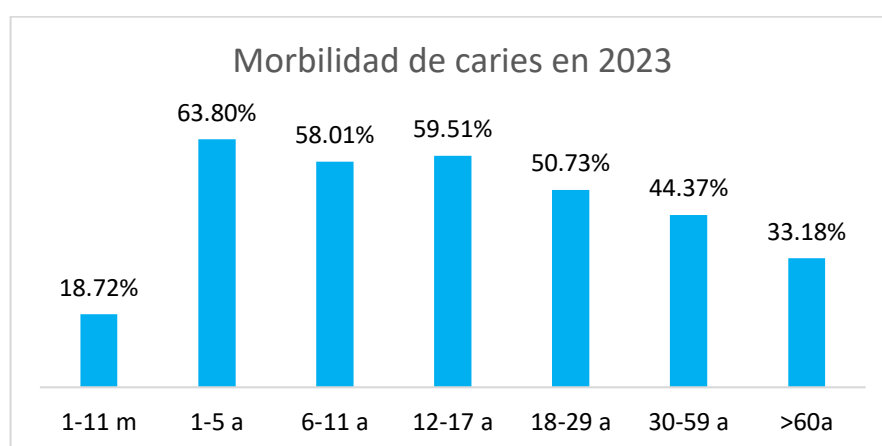
2.11.1 Epidemiología

La caries dental no tratada es la afección más prevalente a nivel mundial y se estima que afecta a 2500 millones de personas, siendo los factores de riesgo como la ingesta elevada de azúcares (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2022).

De 2 711 411 consultas por salud bucal en servicios del MINSA al 5 /09/2023, los casos por caries dental representan el 51.65%. En Ayacucho el 20.7% de total de consultas fueron por caries, con respecto al género, el sexo femenino tiene 8.9% y masculino el 9.1% padecimientos por caries (Ministerio de Salud (MINSA), 2023).

Figura 19

Morbilidad de caries según rangos de edad en Perú



Nota: Se muestra que la dolencia por caries dental va aumentando con la edad hasta llegar un pico en la adolescencia, a partir de la edad adulta va disminuyendo. Esto también a la tercera edad muchos adultos llegan con pocos dientes, los cuales fueron sustituidos por prótesis, entre la adolescencia y edad adulta muchos perdieron piezas dentarias, muchas veces por causa ya mencionada (Ministerio de Salud (MINSA), 2023).

El congreso internacional de estomatología en 2022 realizado en Perú, analizaron la problemática de salud bucal, según la información detallada en el sistema de informaciones en salud (HIS-MINSA), el 60% de los niños de 2 a 5 años, padece de caries dental, 70% en escolares y adolescentes, 98% en adultos (Peña, 2022)

2.11.2 Causas principales

Existen diferentes factores condicionantes para el desarrollo de caries, abordaremos cada una de ellas a continuación

La dieta

Los alimentos que el ser humano consume son fuente de nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos que constituyen la biopelícula de la cavidad bucal,

Sin embargo, una dieta a base de carbohidratos hace que descienda el pH de la saliva en consecuencia de la placa bacteriana, en un estudio realizado en niños con diferentes estados de higiene oral, muestra que hay una proporcionalidad directa al descenso del pH salival y basal, después de consumir el chocolate comercial, pero el pH no desciende a niveles de <5.5 de desmineralización (hidrogenación de hidroxiapatita), mientras que la dentina se desmineraliza a niveles < 6.7 de pH (Aguirre & Vargas, 2012).

Figura 20

```

graph TD
    subgraph Cavidad_bucal [Cavidad bucal]
        S_Mutans[S. Mutans] --> Enzimas[Exoenzimas  
Glucosiltransferasa  
Fructosiltransferasa]
        S_Salivarius[S. Salivarius,  
A. Viscosus] --> Sacarosa[SACAROSA]
        Enzimas --> Sacarosa
        Sacarosa --> Levanos[Levanos]
        Sacarosa --> Polimeros[Polimeros:  
Dextranos  
Mutanos  
Fructanos (levanos)]
        Sacarosa --> Dextranos[dextranos]
        Levanos --> Fuente[fuente de reserva  
de energía]
        Fuente --> Glucosa_Fructosa[Glucosa+ Fructosas]
        Polimeros --> Sint_Nutrientes[Sint. En  
aumento  
de  
nutrientes]
        Sint_Nutrientes --> Glucosa_Fructosa
        Polimeros --> Mutanos[Mutanos]
        Mutanos --> Adhesivos[adhesivos]
        Adhesivos --> Adhesion[adhesión bacteriana]
        Polimeros --> Favorecen[Favorecen la unión de proteínas  
fijadoras]
        Favorecen --> Adhesivos
        Dextranos --> Reserva[Reserva de azúcares  
extracelulares]
        Reserva --> Glucosa[Glucosa]
        Glucosa_Fructosa --> Glucosa_Fructosa_2[Glucosa o fructosa]
        Glucosa --> Glucosa_Fructosa_2
    end
    Glucosa_Fructosa_2 --> S_Mutans_2[S. Mutans]
    S_Mutans_2 --> Celda[Célula bacteriana]
    Celda --> Glucolisis[Glucólisis]
    Glucolisis --> Hplus[H+]
    Hplus --> Disminucion[disminución  
del pH]

```

43

Factor Microorganismos

En el desarrollo inicial de la enfermedad el *S. Mutans* aumenta su concentración para luego formar la biopelícula de placa cariogena a partir de los polímeros sintetizados luego del ingreso de sacarosa, esta bacteria es asociado al comienzo de la enfermedad por su alta adherencia a los dientes dando condiciones favorables para el desarrollo de otras bacterias, como segundo agente es el *S. Sobrinus*, además el *S. mutans* es un rápido productor de ácido láctico, capaz de cambiar un pH 7 a 4,2.

En la progresión de las lesiones aflora *Lactobacilos Spp*, *Actinomyces ssp*, que proliferan en medios ácidos, también otros microorganismos como: *S. Salivarius*, *S. Mitis*, *S. Sanguinus*, todos ellos con la capacidad de disminuir el pH de la saliva en la boca, también en estas condiciones favorece el desarrollo de *Cándida Albicans*, siendo un indicador de Caries. *Lactobacillus* uno de los mayores productores de iones H^+ , esta bacteria es el más implicado en la caries de la dentina.

Factor tiempo y dieta

Para que ocurra la desmineralización del esmalte dental los carbohidratos fermentables que ingresan a la cavidad bucal deben permanecer en promedio a 20 minutos (Negroni, 2018).

2.11.3 Tratamiento

En el tratamiento de *S. mutans* y *S. salivarius* los agentes iónicos que puedan alterar su baja hidrofobicidad es Li^+ , $NaSCN$, en *S. Sanguinis* reduce su adherencia en 81 a 94%, por el tiocianato de sodio interfiere en la adhesión al esmalte dental, el *S. mutans* puede impedirse su adherencia por compuestos del grupo amino primario, siendo, galactosamina, espermina, manosamina (Negroni, 2018).

Gluconato de clorhexidina (1,6-di(4-clorofenil-diguanida) hexano) $^+$, el compuesto mencionado tiene la capacidad de unirse con superficies de cargas negativas, esto principalmente con las paredes de las células bacterianas, por tal motivo tiene su actividad bactericida. También altera los factores de precipitación en la saliva, la clorhexidina tiene diferentes presentaciones, aerosol al 0,12%, barniz al 1%, pasta dental al 0,12% (Negroni, 2018).

Como otro tratamiento tenemos a los fluoruros, que activan sobre las células bacterianas y alteran su crecimiento al inhibir el metabolismo energético, siendo el F^+ interviniente el ciclo de Krebs del metabolismo bacteriano (Negroni, 2018).

2.12 ANTIBIOGRAMA

La sensibilidad microbiana (antibiograma), es para simular una situación en la que los microorganismos como las bacterias, son capaces de crecer en presencia de uno o varios fármacos antimicrobianos (Sociedad Española de Medicina de Laboratorio, 2019).

El antibiograma se realiza para bacterias una vez sabido que estos microorganismos son los responsables de una infección mediante el cultivo correspondiente, la prueba determina la eficiencia de un agente antimicrobiano frente al microorganismo que ocasiona la infección o hay resistencia. También sirve para seleccionar el antimicrobiano que sea más efectivo para tratar la infección (Sociedad Española de Medicina de Laboratorio, 2019).

2.12.1 Halo inhibición

En pocas palabras, es el área que rodea a un disco de antibiótico que no muestra crecimiento bacteriano en una placa de agar infectada con el patógeno. Es una medida de la potencia del antibiótico frente al microorganismo estudiado (Centro de Bachillerato Tecnológico e Industrial y de servicios No. 128, s.f)

2.12.2 Escala Mac. Farland

Consiste en la preparación de una serie de tubos (11), herméticamente cerrados, que contiene la mezcla de H_2SO_4 1% y BaCl_2 1,175%, que al combinarse forman un precipitado blanco siendo BaSO_4 , esta mezcla se estandariza en el espectrofotómetro, cada uno del estándar corresponde a una concentración conocida de ufc/mL. Para cada vez que se requiera el uso de una cepa bacteriana se establece la equivalencia de la turbidez, en el caso del antibiograma está estandarizado para trabajar con el 0.5 Mc Farland, la duración de la escala es solo por 6 meses, con almacenamiento en completa oscuridad, para verificar la correcta preparación de los reactivos antes mencionados, debe identificarse la aparición de precipitado blanco, además de que la curva de absorbancia debe tener una línea de tendencia recta, a menor escala Mc Farland, menor será la absorbancia de la muestra, aunque la escala más usado para el caso de evaluación de sensibilidad microbiana es la escala 0,5 (Cabeza , 2013)

Tabla 11*Combinación de soluciones para escala Mac Farland*

ESTÁNDAR MC FARLAND	H₂SO₄ 1%	BaCl₂ 1,175%	UFC/mL
0,5	9,95 mL	0,05 mL	1,5*10 ⁸
1	9,9 mL	0,1 mL	3*10 ⁸
2	9,8 mL	0,2 mL	6*10 ⁸
3	9,7 mL	0,3 mL	12*10 ⁸
4	9,6 mL	0,4 mL	15*10 ⁸
5	9,5 mL	0,5 mL	18*10 ⁸
6	9,4 mL	0,6 mL	21*10 ⁸
7	9,3 mL	0,7 mL	24*10 ⁸
8	9,2 mL	0,8 mL	27*10 ⁸
9	9,1 mL	0,9 mL	30*10 ⁸

Nota. Elaboración propia basado en (Cabeza , 2013)

2.13 MEDIOS DE CULTIVO

2.13.1 Agar tripticasa soya (TSA)

Es un medio usado para el crecimiento y aislamiento de gran variedad de microorganismos, aerobios, anaerobios, facultativos y estrictos, al contener sangre y clara de huevo favorece su crecimiento. En la composición del medio se encuentra la triproteína y la peptona de soya, aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas, pirimicas, carbohidratos que estimulan el crecimiento microbiano, el NaCl (cloruro de sodio) mantiene la osmosis y el agar es el agente solidificante. Al ser suplementado o enriquecido puede convertirse en un agar selectivo, para bacterias exigentes se debe incubar a 35-37°C por 24-48 horas (Britania Lab, 2021).

2.13.2 Agar Mueller Hinton (MH)

Medio de cultivo universalmente recomendado para realizar la sensibilidad de antibacterianos, es un medio nutritivo no selectivo que favorece el desarrollo microbiano

esta recomendación fue realizada por National Committee for Clinical Laboratory Standard para ser usado en forma rutinaria en la prueba del antibiograma en medio sólido porque tiene buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas. Su contenido de inhibidores de sulfonamidas trimetropina y tetraciclina es bajo por ello la mayoría de los patógenos crecen satisfactoriamente, para realizar la prueba en estreptococos es recomendable enriquecer con sangre de carnero. La composición en g/ L es, infusión de carne 300, peptona ácida de caseína 17,5, almidón 1,5, agar 15, pH final de 7,3 $\pm$ 0.1 (Britania Lab, 2021).

Procedimiento de uso. 38 de polvo MH en litro de agua destilada, homogenizar, esterilizar a 121°C por un tiempo de 15 minutos, trasvasar a placas de 9cm de diámetro entre (25-30mL). **Siembra**, Hisopado en superficie con el inóculo a 0,5 Mac Farland,

Incubación

Para *estreptococcus* con 5% de CO₂, 35°C $\pm$ 2°C, 20 a 24 horas (Britania Lab, 2021)

2.14 ANÁLISIS SENSORIAL

“El análisis sensorial es una evaluación de las cualidades organolépticas de un producto mediante los sentidos humanos. En otras palabras, evalúa el aspecto, el olor, la fragancia, la textura y el sabor de un producto o materia prima” (García M. , s.f)

2.14.1 Pruebas afectivas

Es una prueba para consumidores por tanto el juez es el consumidor, aunque también puede ser un juez experto, catador especializado, la cantidad de pruebas a realizar depende del tipo de juez, la característica de la prueba afectiva es, el juez responde a preguntas sobre el producto, gusta o no, que cualidades le gusta o disgusta, que tipo de consumidores prefieren el producto. La cantidad de jueces es una muestra representativa de 25-35 a mayor número jueces el resultado será más cercano al consumidor (Talavera, 2023).

Para la evaluación de prueba debe realizarse en un lugar ventilado, libre de olores, con iluminación a 540 lux, ambiente de color blanco de preferencia. Dependiendo del producto a evaluar la muestra debe tener las características físicas que son a fin al producto, ejemplo, si es un chocolate, su presentación debe ser la forma de tabletas o bombones, no se debe hacer esperar a los jueces, debe realizar la prueba luego de 2 horas de la última comida, los jueces no deben haberse puesto perfume, no se debe realizarse en una persona cuando se encuentra enojado (Talavera, 2023).

2.14. 2 Método estadístico de diseño experimental

a) Diseño completamente al azar balanceado

El objetivo de este diseño es comparar los tratamientos asignados en forma aleatoria a las unidades experimentales o viceversa, sin ninguna restricción, por lo tanto, se considera que es un diseño eficiente cuando las unidades experimentales de los que se dispone son muy homogéneas, debido a su simplicidad, el diseño completamente al azar es usado frecuentemente cuando el objetivo es comparar más de dos tratamientos, cuando las muestras son homogéneas, en este caso las muestras son homogéneas y la medida de la variable de respuesta se realiza con un instrumento (Velasquez, 2017).

En este diseño las observaciones se podrán escribir en un modelo estadístico lineal

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

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta (tamaño del halo inhibición)

t_i = variable independiente (tratamiento con aceite de copaiba)

ε_{ij} = error de su respectiva variable de respuesta

b) Diseño bloque completo al azar

Es un diseño que considera tres fuentes de variabilidad: **el factor tratamiento, el factor de bloque y el error aleatorio**, es decir se tiene tres posibilidades, la palabra completo en el nombre del diseño se debe a que en cada bloque se prueban todos los tratamientos, o sea, los bloques están completos, la aleatorización se hace dentro de cada bloque(jueces), donde los factores del bloque entran es un nivel de importancia secundaria con respecto al factor de interés y este sentido solo se estudia el factor de interés, en caso de comparar la evaluación sensorial se usa este diseño por el hecho que los evaluadores son muestras heterogéneas y cuyas respuestas son subjetivas y heterogéneas, el modelo estadístico queda como se muestra (Velasquez, 2017).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, \tau (\tau = \text{tratamiento}), j = 1, 2, \dots, r (r = \text{bloques})$$

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

1 fiola de 500 mL
1 fiola de 250 mL
3 matraz Erlenmeyer de 500mL
1 matraz Erlenmeyer de 250mL
2 pinza microbiológica
1 mechero de bunsen
40 placas Petri de 9cm de diámetro
2 gradillas
5 piezas de papel kraf
1 caja de ligas
250 g de algodón
2 pipetas de 1mL
2 pipetas de 5 mL
2 pipetas de 10 mL
2 frascos de vidrio de 250 mL
1 propipeta
10 tubos de ensayo pírex con tapa
20 tubos de ensayo
1 porta objetos
1 cubre objetos
1 vernier de 15 cm, con graduación en mm

- 1 moldes de 50 g (para tableta de chocolate)
- 50 platos rectangulares de color blanco (evaluación sensorial)
- 5 L de agua de mesa (evaluación sensorial)
- 50 copias de instrumento de evaluación sensorial

3.1.2 EQUIPOS

- 1 Balanza analítica de 0,0000g
- 1 micro pipeta de 200 micro litros
- 1 microscopio
- 1 autoclave
- 1 incubadora
- 1 espectrofotómetro
- 1 refinadora de rodillos
- 1 molino
- 1 tostador de cacao
- 1 atemperador (mesa de granito)
- 1 micrómetro (medir tamaño de partícula)
- 1 visicooler
- 1 selladora de bolsas

3.1.3 INSUMOS

PARA ESCALA MC FARLAND:

- Cloruro de bario BaCl_2
- ácido sulfúrico H_2SO_4
- 1 L de agua destilada

PARA ANTIBIOGRAMA:

- 1 L de cloruro de sodio al 0,9% (suero fisiológico)
- 1 Lugol
- 1 frasco de agar Muller Hinton 500 g
- 1 frasco de agar tripticasa soya 500 g
- Cultivo microbiano de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175
- 10 Hisopos estéril
- 10 jeringa estéril de 1mL

3.2 METÓDO

a) Tipo de investigación

Investigación cuantitativa experimental

b) Nivel de investigación

Exploratoria

Correlacional

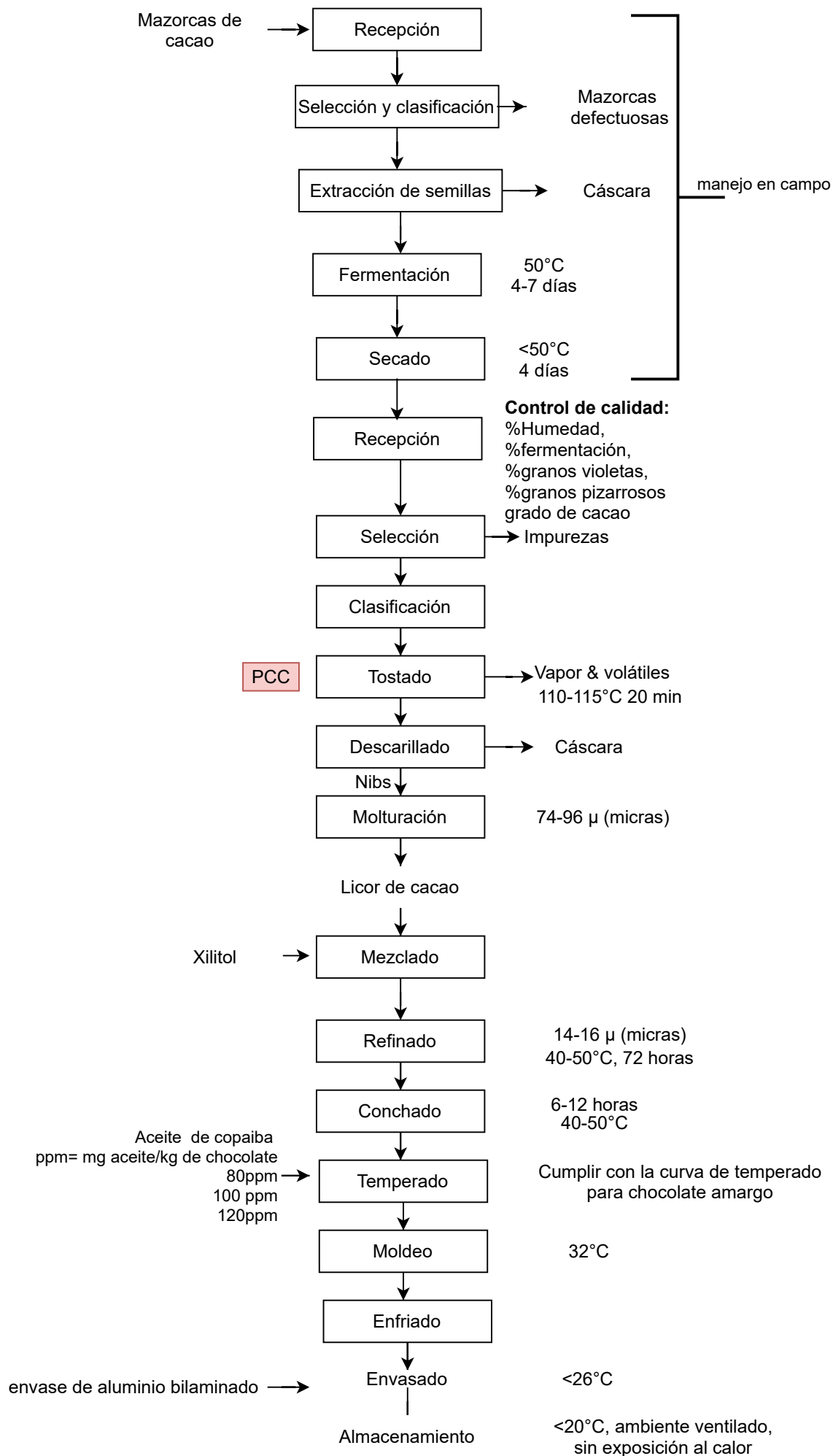
c) Población: Cacao proveniente de VRAEN del distrito Pichari

d) Muestra: El cacao proveniente del centro de acopio de Cooperativa Agraria Qori Warmi

e) lugar de procesamiento del chocolate en planta de procesamiento de cacao y café de la empresa Royal Raymi S.A Huamanga-Ayacucho

e) lugar de ejecución para evaluación de inhibición microbiana, laboratorio de inmunología de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, con supervisión y colaboración de la docente de Microbiología Clínica Mg. Kusi Yaranga Palomino.

3.2.1 Elaboración del chocolate al 70% de cacao con xilitol al 30%



3.2.2 Descripción del proceso

a) Recepción de materia prima

La materia prima es proveniente de la Cooperativa Qori Warmi, perteneciente al valle de los ríos Apurímac Ene y Mantaro (VRAEM), con trato directo a los productores de cacao, de las variedades clonales criollo ganso.

La recepción se realizó con el control de calidad respectivo, determinación de humedad, prueba de corte de cacao con guillotina y evaluación sensorial. teniendo como resultado en capítulo correspondiente

la prueba de corte se realizó con 50 granos de cacao escogidos aleatoriamente, se muestra en el anexo 3, se muestra la medida de la humedad que se realizó en un hidrómetro, se muestra en el anexo 3.

b) Selección de materia prima

La selección de granos de cacao se realizó de manera manual

c) Tostado

El tostado de los granos de cacao es en un tostador rotario manual, cuya fuente de energía para el motor es la electricidad, para el tostado, es el gas licuado de petróleo (GLP). El tostado se realiza con 25 kg de granos de cacao a la temperatura de 115-120°C basado en (Beckett, 2002, 56) & (Schuhmacher et al., 1998, 37) durante 20 minutos en promedio.

En el proceso de tostado hay pérdida de elementos volátiles propias del cacao, también esta es el único proceso que tiene el punto de control crítico (PCC), las características del equipo tostado son las que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 12

Tostador

Tostador	
Capacidad	25 kg/Bach
Material	acero inoxidable 304

d) Descascarillado

El descascarado del cacao se realiza en un descascarrillador cuyas características se muestran en la siguiente tabla. En este proceso se tiene como producto secundario a la cáscara de cacao siendo una pérdida de 3.4 kg por cada batch de 20 kg en promedio de cacao tostado, el proceso del batch, tiene un tiempo de duración de 10 minutos en promedio.

Tabla 13

Descascarillador

Descascarillador	
Capacidad	20 kg/bach
Material	acero inoxidable 304
Potencia	1,5 Hp

En este proceso se obtiene el denominado nibs de cacao, del cual se obtiene la pasta de cacao o licor de cacao.

e) Molienda o Molturación

Los nibs de cacao se vertió al molino de discos, en el cual se moltura hasta obtener una pasta de 120-130 μ (micras), la temperatura a la que sale la pasta del molino es de 54 °C, se describe al molino de disco. Parámetro de tamaño de partícula obtenido de acuerdo a la experiencia en molienda en el molino de disco a condiciones ambientales de temperatura en la ciudad de Ayacucho mes de febrero.

Tabla 14

Molino de disco

molino de disco	
Capacidad	30 kg/h
Material	acero inoxidable 304
Potencia	10 Hp

F) Mezclado y Refinado

F1) Mezclado

en este proceso se cuantificó la cantidad en masa de pasta de cacao (70%), xilitol (30%), de tal modo que el cacao es el 70% del total del producto. La mezcla se realiza en el

mismo refinador con giro a 30 rpm. Las revoluciones para el proceso de mezcla debe ser una velocidad que permita la integración de los componentes sin poner en peligro el funcionamiento del equipo

F2) Refinado y Conchado

este proceso tuvo un tiempo de duración de 72 horas en promedio, en el refinador de rodillos, a una temperatura de refinado de 40-45 °C, a una revolución de 100 rpm, para determinar la finalización del proceso se midió las micras de las partículas con un micrómetro, siendo los valores frecuentes de 14-15 μ (micras) parámetros de temperatura y tamaño de partícula basado en (JOHFREJ C&V Chocolates, 2022) & (Schuhmacher et al., 1998, 45).

Conchado, este proceso llevó un tiempo de 16 horas a una temperatura de 45°C basado en (Schuhmacher et al., 1998, 45) con el refinador para favorecer la reducción de percepción de aromas de los volátiles no deseados, donde se alisa la superficie irregular de cada partícula en el chocolate edulcorado con xilitol. En la siguiente tabla se detalla las características del refinador conchador.

Tabla 15

Refinador de rodillos

refinador de billas	
Capacidad	68kg/h
Material	acero inoxidable 304
Potencia	2 Hp

G) Temperado

El temperado se realizó por el método de siembra (incorporar una parte del chocolate en la mesa, para elevar la temperatura incorporara la otra parte) en una superficie de mármol, usando una espátula que favorece el cizallamiento y obtención de cristales del tipo V (cinco o beta), para obtener un producto brillante y uniforme, duro al tacto con chasquido al corte manual, en esta etapa del proceso se incorporó el aceite copaiba en concentraciones (*mg aceite de copaiba(resina)/kg chocolate*) de (80ppm, 100ppm, 120ppm), la temperatura se disminuyó hasta los 28°C para luego subir hasta 32°C. Este proceso dura en promedio 10 minutos, parámetro basado en (Schuhmacher et al., 1998, 47).

H) Moldeado

El moldeado se realizó en moldes para en tableta de 50 gramos, luego de cuantificar la masa, se lleva al vibrador para aportar la energía suficiente y eliminar las burbujas que quedan atrapadas, el vibrador es a 46-47 ciclos.

I) Enfriado

Los moldes llenos fueron colocados en una cámara de frío durante 15 minutos en promedio a una temperatura de 1-2°C.

J) Envasado

El desmoldado se realizó en una superficie limpia, para colocar las tabletas de chocolate en un envase tr laminado de aluminio, a continuación, las bolsas fueron selladas a una temperatura de 105°C, este envase primario

3.2.2 Preparación de soluciones para la escala Mc Farland

El uso de las soluciones será para ver la turbidez al mezclar la solución de ***H₂SO₄ al 1%*** con la solución de ***BaCl₂ al 1,175%*** como se describe en la tabla de combinación de soluciones para la escala Mc Farland basado en (Cabeza , 2013) para tener en conocimiento que se trabaja con esa concentración de UFC.

a) Preparación de sol de H₂SO₄ al 1%

Cálculos

$$V_{\text{sol}} = 500 \text{ mL}$$

$$1\% \frac{p}{v} = \frac{g(s) * 100}{\text{mL(sol)}} = \frac{x * 100}{500 \text{ mL}}$$

$$g(s) = 5g$$

$$\rho_{H_2SO_4} = 1,83 \frac{g}{\text{mL}}$$

$$\text{mL}(s) = 5g * \frac{1\text{mL}}{1,83g} = 2,72\text{mL}$$

Preparación

En una fiola de 500mL, colocar agua destilada hasta la mitad, trasvasar los 2.72 mL de H₂SO₄ de la pipeta, llenar agua destilada hasta el aforo, mezclar suavemente.

b) Preparación de sol de $BaCl_2$ al 1,175%

Cálculos

$$V_{sol} = 250 \text{ mL}$$

$$M_{BaCl_2} = 208,233 \text{ g/mol}$$

$$M_{BaCl_2 \cdot 2H_2O} = 244,2635 \text{ g/mol}$$

$$1,175\% \frac{P}{V} = \frac{g * 100}{250 \text{ mL}}$$

$$m_{BaCl_2} = 2,9375 \text{ g}$$

$$m_{BaCl_2 \cdot 2H_2O} = \frac{m_{BaCl_2} * 244,2635 \text{ g/mol}}{208,233 \text{ g/mol}} = \frac{2,9375 \text{ g} * 244,2635 \text{ g/mol}}{208,233 \text{ g/mol}}$$

$$m_{BaCl_2 \cdot 2H_2O} = 3,4461 \text{ g}$$

Preparación

-Pesar 3,4461g de $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ (cloruro de bario di hidratado)

-En una fiola de 250mL, colocar agua destilada hasta la mitad, incorporar el cloruro de bario di hidratado, llenar agua destilada hasta el aforo, mezclar suavemente.

Preparación de escala Mac Farland

Se preparó 10 tubos con las soluciones preparadas, combinando en cantidad como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 16

Combinación de soluciones para escala Mac Farland

ESTÁNDAR MC FARLAND	H2SO4 1%	BaCl2 1,175%	Vf
0.5	9,95 mL	0,05 mL	10 mL
1	9,9 mL	0,1 mL	10 mL
2	9,8 mL	0,2 mL	10 mL
3	9,7 mL	0,3 mL	10 mL
4	9,6 mL	0,4 mL	10 mL
5	9,5 mL	0,5 mL	10 mL
6	9,4 mL	0,6 mL	10 mL
7	9,3 mL	0,7 mL	10 mL
8	9,2 mL	0,8 mL	10 mL
9	9,1 mL	0,9 mL	10 mL

Nota. Elaboración propia basado en (Cabeza , 2013) Al combinar las soluciones de ácido y sal, se presenta turbidez de la solución, que da una coloración blanquecina, como se muestra en resultados y figura 24.

3.2.3 Diagrama del diseño experimental para halo de inhibición microbiana de chocolate con aceite de copaiba

a) Activación de cepa ATCC

1. Se abre el sobre de La cepa ATCC 25175 de *Streptococcus mutans*
2. Se humedece la cepa liofilizada activado la válvula dentro del tubo que contiene la cepa
3. Se deja 15 minutos a temperatura ambiental
4. Se tiene disponible medio de cultivo de agar TSA estéril en placa Petri 4mm de altura
5. Se siembra el cultivo con el hisopo incorporado en el sobre la cepa ATCC, en condiciones estériles (al costado del mechero bunsen encendido)
6. Se incuba en condiciones de temperatura constante de 37°C por 24 horas (Yaranga, 2018)

b) Preparación de agar muller Hinton

1. Medir 38 g de agar mueller hinton en una balanza analítica
2. Incorporar rápidamente el medio sobre 1 litro de agua destilada
3. Agitar suavemente el matraz Erlenmeyer hasta humedecer todo el medio de cultivo
4. Tapar con algodón el matraz y cubrir con papel kraf y liga el algodón en el matraz
5. Llevar a esterilizar el medio de cultivo en autoclave, tiempo 15 minutos a temperatura de 121°C a presión de 15 psi
6. Retirar el medio de cultivo una vez enfriado
7. A temperatura de 45°C verter 25mL o 4mm de altura en la placa Petri siempre al costado del mechero de bunsen encendido
8. Dejar solidificar 15 minutos
9. Estará listo la placa con el medio de cultivo (Britania Lab, 2021)

c) Preparación de tubos con solución salina

1. En un tubo de ensayo colocar la mitad solución salina al 0.9% p/v de NaCl (suero fisiológico)
2. Colocar los tubos en una gradilla
3. Tapar los tubos con algodón
4. Llevar a esterilizar los tubos (Yaranga, 2018)

d) Estandarización a escala 0,5 Mc Farland

Sobre una superficie combinada de rayas blancas y negras comparar la solución de las colonias en el tubo con solución salina estéril el estándar 0.5 Mc Farland, de encontrar la misma turbidez está listo la solución con colonias véase anexo 4 fotografía 24 (Yaranga, 2018).

e) Siembra de inóculo

1. La placa con agar muller hinton colocar cerca al mechero de bunsen, abrir la placa Petri, con el hisopo estéril humedecer la solución con colonias bacterianas antes descrita
2. Realizar la siembra en forma de estrías en 3 direcciones con el hisopo estéril
3. Cerrar la tapa de placa
Todos los pasos realizado de acuerdo a lo descrito por (Yaranga, 2018)
4. Del mismo modo para las 12 repeticiones

f) Realización de hoyos de 6mm

1. Dibujar el tamaño de hoyo con la guía de disco de papel filtro de 6mm
2. equidistantes a la cantidad de tratamientos en este caso 5 hoyos
3. colocar la placa al costado de mechero de bunsen y abrir
4. con el sacabocados estéril retirar la circunferencia de 6mm marcado el medio de cultivo
5. queda listo para llenar el hoyo con los tratamientos
Todos los pasos realizado de acuerdo a lo descrito por (Yaranga, 2018)
6. del mismo modo para las 12 repeticiones

g) Incorporación de tratamientos en los hoyos

1. En los hoyos realizados colocar los tratamientos, de tal modo que al centro va el testigo negativo (agua destilada), alrededor los tratamientos de manera consecutiva y el testigo positivo (solución de clorhexidina al 0.12%), el volumen del hoyo es de 150 microlitros (considerando que se trata del volumen del cilindro, diámetro 6mm, altura 4mm)
2. Con una jeringa estéril se toma 150 microlitros de chocolate fundido para incorporar en su respectivo hoyo
3. Con la micropipeta se toma 150 microlitros de los testigos y se incorpora en los hoyos
4. Toda operación se realiza al constado del mechero de bunsen encendido y material estéril
5. Terminado cerrar la placa Petri

Todos los pasos realizado de acuerdo a lo descrito por (Yaranga, 2018)

6. Del mismo modo para las 12 repeticiones

h) Incubación y lectura

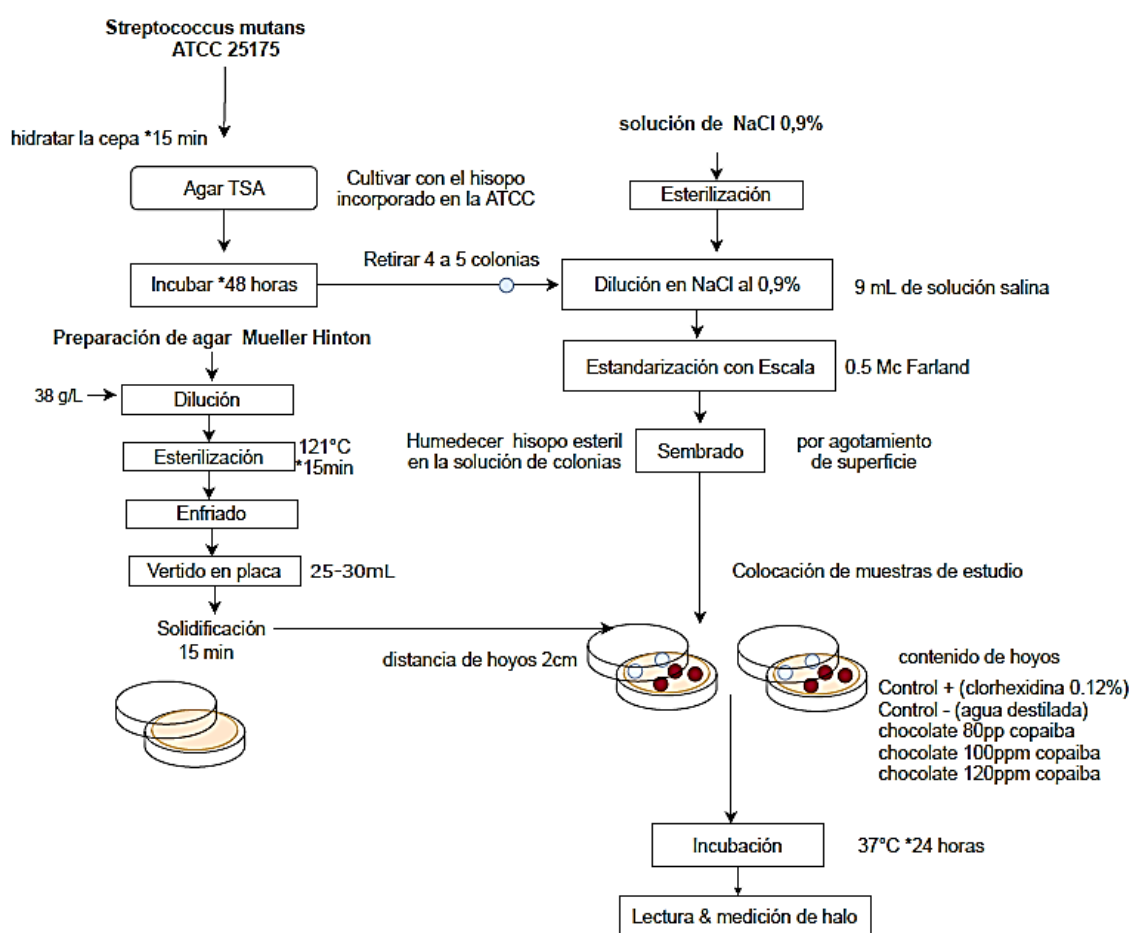
1. Llevar la placa a incubadora cuya temperatura graduada es de 37°C por 24 horas, en este tiempo la temperatura debe mantenerse constante y evitar abrir el equipo hasta terminar las 24 horas
2. Luego de 24 horas realizar la lectura, haciendo la medición del halo con un vernier en mm (milímetros), cabe destacar que la medición del halo es equivalente a decir el diámetro del círculo que rodea al tratamiento, si este presente halo definido y equidistante

Todos los pasos realizado de acuerdo a lo descrito por (Yaranga, 2018)

3. Del mismo modo para las 12 repeticiones

Figura 21

Diseño experimental para medición de halo de inhibición microbiana



Nota: Basado en lo descrito por (Yaranga, 2018) en sus clases de Microbiología General.

3.2.4 Evaluación sensorial del chocolate edulcorado con xilitol y adición de aceite copaiba

Para la evaluación sensorial se siguió la recomendación de (Talavera, 2023) por lo que el producto si es un chocolate, su presentación debe ser la forma de tabletas o bombones, no se debe hacer esperar a los jueces, debe realizar la prueba luego de 2 horas de la última comida, los jueces no deben haberse puesto perfume, no se debe realizarse en una persona cuando se encuentra enojado, triste, en ambiente blanco, ventilado. Se realizó mediante el uso de la escala hedónica de 7 puntos desde (me disgusta extremadamente- hasta -me encanta) con 50 jueces consumidores de 17-hasta 32 años, realizado en laboratorio de análisis de alimentos de la facultad de Ingeniería en Ingeniería Química y Metalurgia. La escala hedónica aplicado se presenta en el anexo 1. Los indicadores para la evaluación de atributos sensoriales son el: color, aroma y sabor.

La calificación de la muestra se tuvo como se muestra en la siguiente tabla

Tabla 17

Calificación mediante la escala hedónica

NIVEL	CALIFICACIÓN
Me disgusta extremadamente	1
Me disgusta mucho	2
Me disgusta un poco	3
Ni me gusta ni me disgusta	4
Me gusta poco	5
Me gusta mucho	6
Me encanta	7

3.2.5 Evaluación estadística de resultados

Para la evaluación estadística de resultados, se aplicará diseño completamente al azar para comprobar la hipótesis de las diferentes concentraciones de aceite copaiba en el chocolate edulcorado con xilitol, para la evaluación sensorial se aplicará el diseño bloque completo al azar. Con un nivel de confianza de 95%, procesando los datos en stragraphis centurión.

Para la medición del halo de inhibición microbiana se utilizó el diseño completamente al azar, que se implementó con la finalidad de evaluar los factores (A, B, C, D) partes por millón de aceite de copaiba incorporados en el chocolate, siendo la variable de respuesta el tamaño del halo de inhibición microbiana (Y) por cada tratamiento realizado, siendo:

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

Donde:

Y_{ij} = variable de respuesta (tamaño del halo inhibición)

t_i = variable independiente (tratamiento con aceite de copaiba)

ε_{ij} = error de su respectiva variable de respuesta

Control positivo: Sol. Clorhexidina al 0,12%

Control negativo: Agua destilada

Testigo: chocolate con 00ppm

Tratamientos: Chocolate con 80 ppm, Chocolate con 100 ppm, Chocolate con 120 ppm de Aceite Copaiba respectivamente.

- Para la evaluación sensorial se utilizó el diseño bloque completo al azar, siendo el modelo estadístico como se muestra

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

$$i = 1, 2, \dots, \tau (\tau = \text{tratamiento}), j = 1, 2, \dots, r (r = \text{bloques})$$

Dónde:

Y_{ij} = variable de respuesta (nivel de aceptación por indicador)

τ_i = efecto del tratamiento (aceite de copaiba)

β_j = efecto del bloque (jueces)

ε_{ij} = error de su respectiva variable de respuesta

- Nivel de significación: $\alpha = 0.05$
- Región de aceptación y rechazo

Si $F(\text{bloque}) \leq F_{(t-1)(r-1),0.05}^{r-1}$ entonces se acepta la hipótesis nula

Si $F(\text{bloque}) > F_{(t-1)(r-1),0.05}^{r-1}$ entonces se acepta la hipótesis alterna

- Jueces : 50
- Tipo de juez: consumidor habitual
- Tratamientos a evaluar: chocolate con (80ppm, 100ppm, 120ppm) de aceite de copaiba

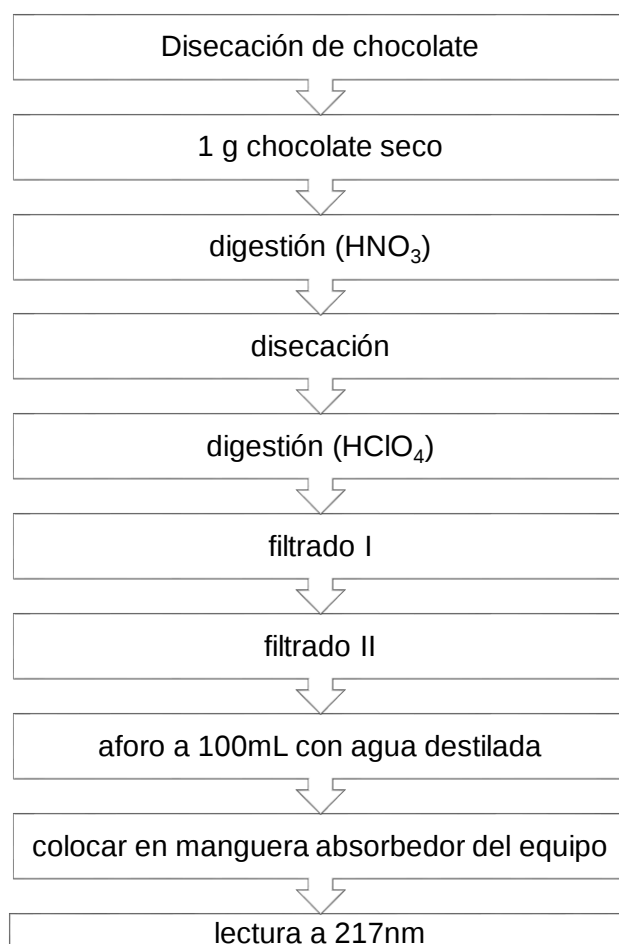
3.2.6 Evaluación de contenido de metales pesados

En este caso evaluaremos el contenido de cadmio y plomo

Por el método AOAC 999.11, realizado por el laboratorio CERTECC, se describe el método mencionado, como se detalla en la siguiente figura.

Figura 22

método para determinación de contenido de metales pesados



Nota. Basado en el diagrama realizado por el laboratorio CERTECC S.A, la evaluación de metales pesados fue realizado por el laboratorio mencionado.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados de control de calidad en recepción de granos de cacao

- Humedad: 5,3%-5,6%
- granos fermentados: 80%
- granos violetas: 5%
- granos pizarrosos: 5%
- granos sobrefermentados: 10%

4.2 Obtención del chocolate

El producto que se elaboró es un chocolate con 70% de cacao, 30% de xilitol, como edulcorante, con tratamientos como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 18

Resumen de tratamientos para evaluación de inhibición microbiana

Tratamiento	%pasta cacao	de	% xilitol	ppm A.Copaiba <i>mg A. Copaiba/kg de chocolate</i>
A(testigo)	70		30	0
B	70		30	80
C	70		30	100
D	70		30	120

Nota: Se muestra los valores en tanto por ciento del componente de las tabletas de chocolate en los 3 tratamientos 1 testigo, con sus respectivas concentraciones de aceite de copaiba, los miligramos de aceite copiba fueron medidos en la balanza analítica del laboratorio de Análisis de alimentos facultad de Ingeniería Química y Metalurgia.

Figura 23

Tabletas de chocolate de 50g al 70% de cacao moldeado



4.3 Escala Mac Farland

Figura 24

tubos del estándar de Mc Farland

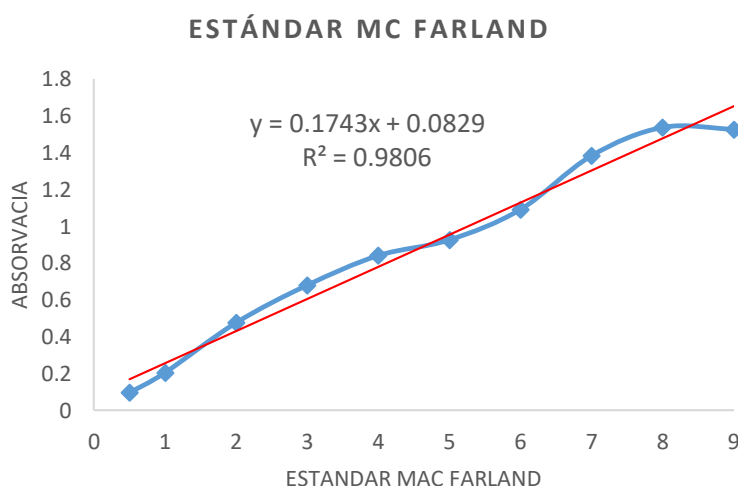


Todos los tubos se llevan a la lectura de la absorbancia a **650 nm** para verificar el grafico, esta escala será usada como referencia en la dilución de la colonias antes de realizar la siembra para medir la sensibilidad de los microorganismos.

Tabla 19*Absorbancia de la escala Mac Farland*

Estándar Mc Farland	Ufc	Abs.
0.5	$1,5 \cdot 10^8$	0,096
1	$3 \cdot 10^8$	0,205
2	$6 \cdot 10^8$	0,476
3	$12 \cdot 10^8$	0,68
4	$15 \cdot 10^8$	0,841
5	$18 \cdot 10^8$	0,926
6	$21 \cdot 10^8$	1,091
7	$24 \cdot 10^8$	1,383
8	$27 \cdot 10^8$	1,537
9	$30 \cdot 10^8$	1,527

Nota: Elaboración propia, basado en (Cabeza , 2013) sobre el número de unidades formadoras de colonias en los diferentes tubos de la escala Mac Farland.

Figura 25*Estándar Mac Farland*

Nota. Elaboración propia, el estándar usado es para realizar la prueba de antibiograma es el de 0,5 Mc Farland, a 650 nm, corresponde a la absorbancia 0,096, siendo $1,5 \cdot 10^8$ ufc/mL, la gráfica de la curva se realiza con el fin de observar la desviación estándar de los datos a través de R^2 , por tanto está bien calibrada el estándar 0,5 Mac Farland, su aplicación es para comprobar la turbidez del inóculo que se va a usar en la siembra del microorganismo (igual turbidez de la solución a la escala 0,5 Mc Farland)

4.3 Prueba de antibiograma para la inhibición microbiana

Tabla 20

Resultados de las evaluaciones para halo de inhibición microbiana, con los 3 tratamientos y tres testigos.

Repeticiones	Clorhexidina 0.12%	Agua destilada	00 ppm	80 Ppm	100 ppm	120 ppm
1	25 mm	6 mm	6 mm	13 mm	13 mm	13 mm
2	24 mm	6 mm	6 mm	13 mm	14 mm	14 mm
3	26 mm	6 mm	6 mm	15 mm	16 mm	17 mm
4	28 mm	6 mm	6 mm	12 mm	13 mm	16 mm
5	28 mm	6 mm	6 mm	14 mm	16 mm	16 mm
6	26 mm	6 mm	6 mm	14 mm	14 mm	15 mm
7	27 mm	6 mm	6 mm	11 mm	11 mm	13 mm
8	25 mm	6 mm	6 mm	11 mm	13 mm	14 mm
9	26 mm	6 mm	6 mm	13 mm	13 mm	15 mm
10	26 mm	6 mm	6 mm	13 mm	12 mm	13 mm
11	25 mm	6 mm	6 mm	16 mm	15 mm	17 mm
12	26 mm	6 mm	6 mm	15 mm	15 mm	17 mm

Nota: El resultado mostrado de 6mm del agua destilada y chocolate sin copaiba, son en diámetro del disco u hoyo, por considerar este diámetro en las otras pruebas, en la tabla se detalla los resultados para la variable de respuesta inhibición microbiana, medido con vernier en placa petri, siendo el diámetro del halo equidistante, donde: **control positivo** (Clorhexidina al 0,12%), **control negativo** (Agua destilada), **testigo** (chocolate con 00ppm), **tratamientos:** Chocolate. 80ppm, Chocolate.100ppm, Chocolate.120 ppm. El tamaño de halo de inshibición, como se muestra en el anexo 4 fotografía 31.

Tabla 21*ANOVA para la variable respuesta*

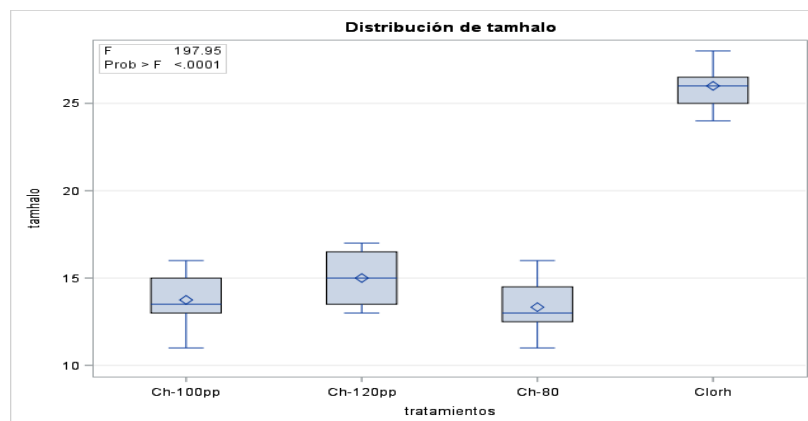
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	1308,062500	436,020833	197,95	<,0001
Error	44	96,916667	2,202652		
Total	47	1404,979167			
corregido					

Nota: En la tabla se muestra, diferencia significativa para la variable de respuesta

Tabla 22 R^2 coeficiente de variación para el arreglo DCA

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Tamaño de halo Media
0.931019	8,719510	1,484133	17,02083 mm

Nota: En la tabla se muestra el valor de R^2 , el coeficiente de variación, la media del tamaño de halo de 15 mm del tratamiento de 120ppm efectuado a una significancia de $p < .0001$, en el tipo de arreglo DCA.

Figura 26*Distribución de tamaño de halo con control positivo y los tratamientos*

Nota: Se muestra en la figura, que el control positivo clorhexidina al 0,12% tiene un valor de 26 mm, como media, siendo estadísticamente el mejor valor, siendo alto en un 42% más, que el tratamiento de 120ppm

Tabla 23

ANOVA de los tratamientos de 80 ppm 100 ppm 120 ppm de aceite de copaiba

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	18,05	9,027	3,68	0,0360
Error	33	80,91	2,452		
Total corregido	35	98,972			

Nota: La F calculada es mayor a la F tabulada a un nivel de confianza de 95%, entonces al menos 1 de los 3 tratamientos es diferente, esto es confirmada por la $p < 0,05$, se acepta la hipótesis de que 1 tratamiento tiene mejor valor para la variable de respuesta tamaño de halo de inhibición microbiana.

Tabla 24

Prueba de DUNCAN

Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamientos
A	26,000 mm	12	Clorhexidina 0,12%
B	15,000 mm	12	Ch-120 ppm
C	13,750 mm	12	Ch-100 ppm
C	13,333 mm	12	Ch-80 ppm

Nota: Se muestra la media del control positivo (clorhexidina al 0,12%), los tratamientos, Ch-120ppm (chocolate con 120ppm de aceite de copaiba), Ch-100 ppm (chocolate con 100ppm de aceite de copaiba), Ch-80 ppm (chocolate con 80ppm de aceite de copaiba), el agrupamiento DUNCAN para la diferencia de las medias. Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes a un intervalo de confianza de 95%."

Las medias con la misma letra no son significativamente diferentes, pero las medias de Clorhexidina 0,12%, del tratamiento con 120ppm de aceite copaiba, son significativamente diferentes, estudiado en un nivel de $p < 0,05$, mientras que los tratamientos con 80ppm y 100ppm, no son significativamente diferentes, la actividad antimicrobiana de la solución Clorhexidina 0,12%, es 42% mayor a la actividad antimicrobiana del tratamiento con 120ppm de aceite copaiba, el tratamiento de 80ppm y 120ppm son estadísticamente diferentes, la actividad antimicrobiana del aceite de copaiba se debe principalmente al contenido de sesquiterpenos en 90%, que estos mismo contienen compuesto llamado farnesol con propiedad antimicrobiana como agentes de defensa a la contaminación por bacterias a la planta (Pasquel, y otros, 2018). Según (Negroni, 2018) el Gluconato de clorhexidina (1,6-di(4-clorofenil-diguanida) hexano)⁺, tiene su actividad bactericida por la capacidad de unirse con superficies de

cargas negativas de las células bacterianas, se encuentra en venta en diferentes presentaciones, aerosol al 0,12%, barniz al 1%, pasta dental al 0,12%. Queda demostrado la actividad antimicrobiana de la clorhexidina, como también de aceite de copaiba en combinación con el chocolate. También el resultado obtenido en esta investigación coincide con lo obtenido por (Godoy, 2017), donde muestra el efecto antibacteriano de aceite de copaiba sobre *streptococcus mutans* a concentraciones de 15% es estadísticamente significativa entre los tratamientos, pero no hubo diferencia significativa en los tratamientos de 10% y 15% de aceite de copaiba. En los resultados obtenidos de esta investigación se muestra que a mayor concentración de aceite de copaiba en el chocolate tiene un efecto más significativo sobre el crecimiento de *streptococcus mutans* a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 25

Prueba de DUNCAN entre los tratamientos

	Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamientos
	A	15,00 mm	12	Ch-120 ppm
B	A	13,75 mm	12	Ch-100 ppm
B		13,33 mm	12	Ch-80 ppm

Nota: El agrupamiento DUNCAN para la diferencia de las medias de los tratamientos, Ch-120ppm (chocolate con 120ppm de aceite de copaiba), Ch-100 ppm (chocolate con 100ppm de aceite de copaiba), Ch-80 ppm (chocolate con 80 ppm de aceite de copaiba), las medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Los resultados presentados en esta investigación coinciden con la afirmación de la propiedad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* incorporado en tableta de chocolate al 80ppm, 100ppm, 120ppm, como lo menciona, (García R. , 2013) en su investigación realizada sobre el uso de aceite de la corteza de *Copaifera officinalis*, en cepas bacterianas periodotopatógenas, también (Arroyo, y otros, 2011) demostró el aceleramiento de la cicatrización de úlceras pépticas con 80mg, 120mg de aceite de copaiba, en pacientes que padecían esta dolencia, sin embargo lo que menciona Correa, (2017,) sobre el efecto antimicrobiano de *Streptococcus mutans* del chocolate edulcorado con xilitol, considerando 6 g de chocolate con 1, 2, 3, 4, 5 y 6 g de xilitol, tiene un efecto antimicrobiano, es discrepante con los resultados obtenidos en esta investigación, donde se demuestra en la tabla 20, el resultado del chocolate edulcorado con 30% de xilitol (combinación promedia de 6g con 3 gramos de xilitol) obtuvo un halo

de inhibición microbiana de 17,4 mm de halo según Correa, (2017), en esta investigación no tiene un efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans*, esto tal vez pudo haber sido afectado por el tipo de procedimiento realizado en la investigación de Correa, (2017) que el chocolate no se refina, tampoco se muestra el tamaño de partícula del chocolate, en cambio en esta investigación se trabajó con un chocolate edulcorado con xilitol refinado hasta un tamaño de partícula de 14-16 micras, también mencionamos que es diferente la medida de tamaño de halo de inhibición microbiana con tamaño de halo de difusión donde se evidencia crecimiento de *Streptococcus mutans*, puede confundirse fácilmente, pero en esta investigación se observó que el tamaño de halo de difusión es superior al tamaño de halo de inhibición microbiana, para determinar el halo de inhibición microbiana se define como. Alrededor de un disco en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el microorganismo. (Centro de Bachillerato Tecnológico e Industrial y de servicios No. 128, s.f).

4.5 Evaluación de atributos sensoriales

Tabla 26

Arreglo de bloque completamente al azar para los atributos sensoriales del chocolate

BLOQUE Jueces	TRATAMIENTOS											
	COLOR				OLOR				SABOR			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	7	6	6	6	7	5	5	4	6	5	4	4
2	5	5	6	6	7	6	6	7	6	5	5	7
3	7	6	5	5	7	6	5	5	5	5	5	6
4	6	6	5	6	7	7	5	4	5	6	5	7
5	6	6	6	6	6	5	6	5	5	7	5	5
6	6	6	6	6	6	5	4	4	4	5	6	7
7	6	5	5	6	7	6	5	5	3	6	6	5
8	6	5	5	5	7	6	6	5	4	4	3	5
continua												
45	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6
46	6	6	6	6	7	7	7	7	6	6	6	7
47	5	5	5	5	6	6	6	6	7	6	5	4
48	2	3	4	6	3	5	6	6	3	5	6	6
49	7	4	4	7	7	4	6	3	1	5	7	7
50	6	6	6	7	6	7	7	5	6	5	7	6

Nota. La tabla completa se muestra en anexo 2. En esta tabla se muestra los resultados de tratamientos, también el testigo que no tiene aceite de copaiba, identificado como A, donde, **A =0 ppm, B=80 ppm, C=100 ppm, D=120 ppm.**

Los resultados de los indicadores (color, olor, sabor) de la variable atributos sensoriales.

Tabla 27

Prueba de DUNCAN para el color

Duncan Agrupamiento	Media	N	tratamiento
A	5,8800	50	D
A			
A	5,7800	50	B
A			
A	5,7600	50	A
A			
A	5,6400	50	C

Nota: Se muestra que ninguno de los tratamientos es diferente en cuanto al color a la evaluación de los jueces, al ojo humano no hay una diferencia en el color de los tratamientos evaluados.

Tabla 28

Prueba de DUNCAN para el olor

Duncan Agrupamiento	Media	N	tratamiento
A	5,5000	50	C
A			
A	5,5000	50	D
A			
A	5,4600	50	A
A			
A	5,4200	50	B

Nota: Se muestra que ninguno de los tratamientos es diferente en cuanto al color a la evaluación de los jueces, esto porque no es perceptible sensorialmente una diferencia en el olor.

Los resultados para los indicadores, color, olor, fueron encontrados estadísticamente no significativas entre los tratamientos y el testigo, al 95% de significancia, los valores de $p > 0,05$ con mayores alfa, para el color $p = 0,2881$, para olor $p = 0,9624$, como es descrito en el anexo 6.

Se presenta a continuación la tabla para el indicador sabor

Tabla 29

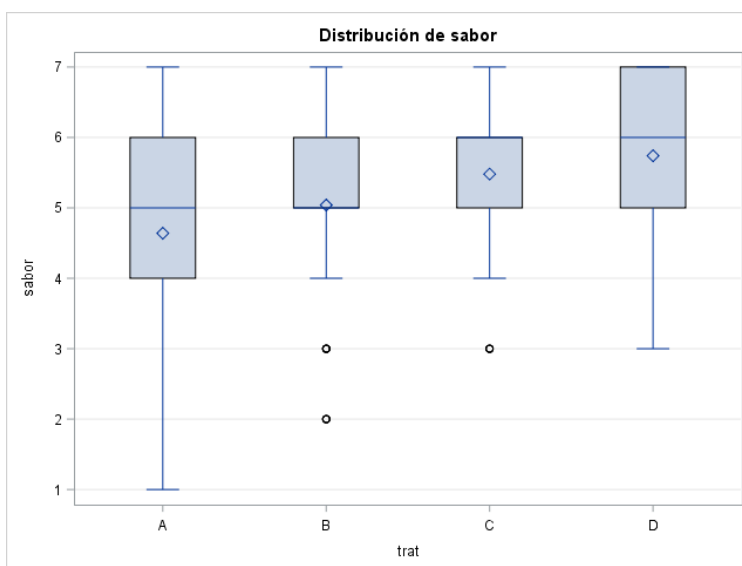
ANOVA (Análisis de Varianza) para SABOR

Fuente	Suma Cuadrados	de GL	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor-P
Efectos principales					
A:CHOCOLATES	35.335	3	11.7783	9.02	<.00001
B:JUECES	149.625	49	3.05357	2.34	<.00001
RESIDUOS	191.915	147	1.30554		
TOTAL	376.875	199			
(CORREGIDO)		99			

Nota: Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual, se muestra que los tratamientos entre si son estadísticamente significativos, debido a que la F calculada es mayor a la F tabulada por tablas, también se muestra que el bloque los jueces son estadísticamente significativos, aduciendo que existe jueces que califican como diferente a los tratamientos, 80pp, 100ppm, 120ppm

Figura 27

Procedimiento ANOVA



Nota: Se muestra que el tratamiento D (120ppm) tuvo mayor aceptación que los otros tratamientos

Tabla 30*Prueba de medias de DUNCAN*

Duncan Agrupamiento		Media	N	Tratamiento
B	A	5.74	50	D (120ppm)
	A	5.48	50	C (100ppm)
	C	5.04	50	B (80ppm)
	C	4.64	50	A (00ppm)

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, en este caso la media del tratamiento D (120ppm) tuvo una media de 5.74, siendo un valor en el intervalo de 5 (me gusta poco) y 6 (me gusta mucho) virando hacia el nivel 6 de aceptación, siendo estadísticamente significativa en la prueba de DUNCAN. Se muestra también que la media de aceptación fue subiendo a medida que la concentración ppm de aceite de copaiba va incrementándose.

Siendo el resultado estadísticamente diferente para la variable de respuesta de halo inhibición microbiana del tratamiento 120ppm, va incremento de la aceptación sensorial con respecto al incremento de la concentración puede haberse influencia por la composición del aceite de copaiba como menciona (Pasquel, y otros, 2018) la composición de este aceite de copaiba es principalmente de sesquiterpenos en un 90%, entre los principales el β -cariofileno. Este compuesto a su vez tiene un sabor picante, maderada, sabor a alcanfor, limón, clavo de olor como menciona (Collado, 2023), estos atributos combinados con la sensación de frescura que produce en el paladar el xilitol (California Dental Association, s.f).

4.6 Análisis de contenido de plomo, cadmio

Se muestra los análisis de metales pesados, así como también el contenido de cacao, realizado en el laboratorio de CERTECC SAC.

Tabla 31

Análisis fisicoquímicos

Ensayos	Unidades	Resultados
Manteca de cacao	%	4,.89
Extracto magro de cacao	%	29,16
Total extracto seco de cacao	%	71,05
Plomo	mg/kg	<0,02(*)
Cadmio	mg/kg	<0,02(*)

Nota: (*) límite de detección <0,02 mg/kg

En los resultados mostrados el contenido de cadmio y plomo fueron menores al 0.02mg/kg, según mencionado por (Jimenez, 2015), las regulaciones internacionales para cadmio tenemos como el valor mínimo de 0.05mg/kg dicho valor establecido por la FDA en los Estados Unidos, en cuanto al plomo se tiene 0.1mg/kg que corresponde a México. Entonces podemos mencionar que el producto elaborado para los tratamientos se encuentra por debajo del límite permisible para ambos metales pesados en las normativas internacionales.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Se elaboró el chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol y adición del aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) para evaluar su efecto en sus características sensoriales e inhibición microbiana, como se detalló en la sección de metodología, se incorporó el aceite de copaiba en concentraciones de 80ppm, 100ppm, 120ppm, en el proceso de temperado, en un chocolate refinado y conchado con tamaño de partícula de 14 micras, el de refinado y mezclado (pasta de cacao 70% y xilitol 30%) se realizó en refinadora de rodillos de granito, con duración de proceso de 72 horas.

Se estableció la concentración de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol que tenga el mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano (*Streptococcus mutans*), siendo en este caso estadísticamente significativa para el tratamiento de 120ppm de aceite copaiba a un nivel de confianza de 95%, con una desviación estándar de 1.5 en promedio.

Se estableció la proporción de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) en chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol que tenga el mínimo efecto sensorial en el producto final, el que tuvo mejor aceptación sensorial en cuanto al sabor fue el tratamiento con 120ppm de copaiba, siendo un valor promedio de 5.74 según la escala hedónica de 7 puntos, encontrándose el valor medio entre el nivel de aceptación me gusta poco (5)- me gusta mucho (6).

Se elaboró un chocolate al 70% de cacao edulcorado con xilitol con diferentes concentraciones de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) dentro de las cuales fueron con adición de 80ppm, 100ppm, 120ppm, con capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano (*Streptococcus mutans*), todos los tratamientos tuvieron capacidad de inhibir el crecimiento microbiano, en cuanto a las características sensoriales adecuadas para el consumidor, tuvo mejor aceptación el tratamiento con 120ppm de copaiba.

CAPÍTULO VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio longitudinal en el efecto del chocolate con 120ppm de aceite de copaiba en personas que tengan tendencia al parecimiento de caries dental
- Se recomienda medir el efecto del cambio de pH saliva al consumir el chocolate del tratamiento recomendado, antes del consumir el producto, después de consumir, pasados los 5 minutos, debido a que en esta investigación no se realizó el efecto de estimular la secreción de saliva del xilitol.
- Se recomienda trabajar con agar Muller Hinton como con agar sangre para definir mejor el halo inhibición debido al halo de difusión de chocolate que fácilmente se puede confundir con halo de inhibición microbiana.
- Se recomienda realizar la prueba sensorial en niños de 2.5 años a 5 años, debido a que en esta etapa se pueda ayudar a mejorar la salud dental para el futuro
- Se recomienda no sobrepasar los gramos de xilitol al día en el chocolate, en una presentación de 45g solo se podría consumir máximo 4 tabletas en diferentes momentos durante el día.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, A. A., & Vargas, S. S. (2012). Variación del pH salival por consumo de chocolate y su relación con el IHO en adolescentes. *Oral*, 857-858. <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2012/ora1241e.pdf>.
- Amazón Andes. (2023). *Tikafarma*. Obtenido de Aceite de Copaiba: visto el 04/10/2023, <https://tikafarma.com/products/aceite-de-copaiba-x-30ml>
- American Society of Microbiology. (16 de junio de 2016). *odontoespacio*. Obtenido de Transmisión de Streptococcus mutans en niños, ocurre dentro y fuera del núcleo familiar: <https://www.odontoespacio.net/noticias/transmision-de-streptococcus-mutans-en-ninos-ocurre-dentro-y-fuera-del-nucleo-familiar/>
- Andino, S., & Nestor, F. (2017). *PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE PRODUCTOS DERIVADOS DEL CACAO*. obtenido de, <https://ria.utn.edu.ar/bitstream/handle/20.500.12272/2752/Producci%C3%B3n%20y%20comercializaci%C3%B3n%20de%20productos%20derivados%20del%20cacao.pdf?sequence=1&isAllowed=y>: [Estudio de frecfatibilidad. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Ingeniería Industrial. Mendoza].
- Arroyo, J., Quinto, M., Martinez, J., Almora, Y., Alba, A., & Condorhuaman, M. (2011). Efecto cicatrizante del aceite de Copaifera officinalis (copaiba), en pacientes con úlcera péptica. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72(2). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832011000200004.
- Barrancos, J., & Barrancos, P. (2006). *Operatoria dental-Integración clínica*. <https://books.google.com.pe/books?id=zDFxeYR8QWwC&pg=PA300&dq=definici%C3%B3n+caries+pdf&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwj86PeG44T5AhXagpUCHUVYCI4Q6AF6BAglEAI#v=onepage&q=definici%C3%B3n%20caries%20pdf&f=false>.
- Beckett, S. T. (2002). *La ciencia del chocolate*. (A. Vercet Tormo, Trans.): Acribia, Editorial, S.A, obtenido de, https://www.editorialacribia.com/libro/la-ciencia-del-chocolate_54280/.
- Belitz, H., Schieberle, P., & Grosch, W. (2009). *Food Chemistry-Coffee, Tea, Cocoa*. In. Springer Berlin Heidelberg, disponible en, https://doi.org/10.1007/978-3-540-69934-7_22.
- Britania Lab. (04 de agosto de 2021). *Muller Hinton Agar*. Obtenido de Britania lab: https://www.britanialab.com/productos/filtrar/2/medios_de_cultivo_deshidratados
- C.A.C Pangoa Ltda. (2016). *MANUAL DE PROCESO DE LA CALIDAD DE CACAO FINO DE AROMA*. Disponible en https://assets.rikolto.org/paragraph/attachments/manual_de_proceso_de_calidad_de_cacao_fino_de_aroma_selva_central_peru.pdf: C.A.C Pangoa Ltda.

- Cabeza, E. A. (2013). *Fundamentos de Microbiología Predictiva: aplicaciones teóricas y prácticas*. Colombia: Universidad de Pamplona Colombia, 9, disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/31825514/Practica_1_MP_2013-II-libre.pdf?1392479182=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DPractica_1_Microbiologia_Predictiva_Desapdf&Expires=169844787.
- California Dental Association. (s.f). *Xilitol*. Recuperado el 6 de May de 2022, de California Dental Association (CDA): <http://www.cda.org>
- Centro de Bachillerato Tecnológico e Industrial y de servicios No. 128. (s.f). *Microbiología*. Obtenido de <https://labdemicrobiologia.wixsite.com/scientist-site/blank-ch2nw>
- Collado, E. (2023). *THE GREEN BRAND*. Obtenido de ¿Qué es el b-cariofileno?: visitado el 10/10/2023, <https://www.growbarato.net/blog/que-es-el-b-cariofileno/>
- Correa, V. (2017). *Efecto inhibitorio del chocolate amargo y chocolate edulcorado con xilitol obtenido del las semillas de cacao (theobroma cacao) frente a streptococcus mutans. estudio invitro*. Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/9577/1/T-UCE-0015-584.pdf>: [Tesis para optar el grado de Odontologa. Universidad Central del Ecuador].
- Cortez, M. (2018). ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LICOR DE CACAO EN LA FÁBRICA DE CHOCOLATES AMAZONAS. [Tesis de grado. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL]. Quito: http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/16744/1/70204_1.pdf.
- Culbert, S., Wang, Y., Fritsche, H., Carr Jr, D., Latín, E., & Van Eys, J. (1986). Oral Xylitol in american adults. *NUTRITION RESEARC*, 6(8), 913-922 [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(86\)80066-5](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(86)80066-5).
- DIGESA. (2018). *Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano*. Obtenido de Dirección General de Salud Ambiental: Visto Abril 9, 2023, from <http://www.digesa.minsa.gob.pe/>
- Dostert, N., Roque, J., Cano, A., & Weigend, M. (2020). *Datos botánicos de cacao*. Obtenido de Promperú. visto el 06/03, 2022: from <https://repositorio.promperu.gob.pe/handle/123456789/1051>
- Flores, M. (2015). Comparación del perfil de ácidos grasos (ESI-MS y RMN) y el contenido de metilxantinas (HPLC-DAD) en granos de Theobroma cacao de siete regiones del Perú. [Tesis para optar el grado de magister en Química, Universidad Pontificia Católica de Perú]. Repositorio, <https://tesis.pucp.edu.pe/repositorio/handle/20.500.12404/16106>.
- García, J., & Hurlé, J. (2005). *Anatomía Humana*. Madrid: MacGraw-Hill Interamerica de España.
- García, J., Gracia, M., Casado, F., & García, M. (2013). Una revisión actual y global de los edulcorantes. Aspectos regulatorios. *Nutrición Hospitalaria*, (28), 4. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112013001000003.

- García, M. (s.f). Análisis sensorial de alimentos. *Revistas y Boletines Científicos*, <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/icbi/n3/m1.html>.
- García, R. (2013). Efecto antimicrobiano de la Óleo-resina de *Copaifera officinalis* sobre principales cepas bacterianas periodontópatógenas de la cavidad bucal. [Tesis de grado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/3460?show=full>.
- Godoy, J. L. (2017). *ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE COPAIFERA OFFICINALIS (COPAIBA) SOBRE STREPTOCOCCUS MUTANS, CHIMBOTE, 2017*. Chimbote, 38, disponible en <https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/4239>: Repositorio.
- Grillo, L., Inostroza, J., Wong, P., & Ybavaleta, C. (2019). *Comercialización de tableta de chocolate hipocalórico libre de azúcar incluyendo insumos autóctonos del Perú*. Lima, https://repositorio.utp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12867/1851/Luis%20Grillo_Julio%20Inostroza_Percy%20Wong_Cesar%20Ybazeta_Trabajo%20de%20Investigacion_Maestria_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y: [Tesis para optar el grado de Maestro en Administración de Empresas. Escuela de Posgrado de la Universidad de Tecnológica del Perú].
- Guerrero, D., Girón, C., Madrid, A., Mogollón, C., Quiroz, C., & Villena, D. (2012). *DISEÑO DE LA LÍNEA DE PRODUCCIÓN DE CHOCOLATE ORGÁNICO*. Obtenido de Universidad de Piura-Facultad de Ingeniería: https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1556/PYT_Informe_Final_CHOCOLATE_ORGANICOv1.pdf?sequence=1
- Homayouni, A., Rasouli, H., Said, O., & Konar, N. (2019). Application of simplex lattice mixture design for optimization of sucrose-free milk chocolate produced in a ball mill. *LWT*, 108435. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643819307777#!>
- Instituto Nacional de Calidad. (2017). *NTP 107.32-Cacao y Chocolate-Términos y definiciones*. Obtenido de <https://salalecturavirtual.inacal.gob.pe:8098/detalle.aspx?id=24620&idtv=6123>: Repositorio.
- Instituto Nacional de Calidad. (2017). *NTP-CODEX STAN 87-Norma del chocolate y los productos del chocolate*. obtenido de, <https://salalecturavirtual.inacal.gob.pe:8098/detalle.aspx?id=24311&idtv=5978>: R.D.N°034-2017-INACAL/DN, Sala de lectura virtual.
- Instituto Nacional de Calidad. (2018). *NTP-ISO 2451-Granos de cacao. Especificaciones y requisitos de calidad*. Obtenido de Sala de lectura virtual INACAL: (11- 12), R.D. N° 015-2021-INACAL/DN., <https://salalecturavirtual.inacal.gob.pe:8098/datos.aspx?id=24011>.
- Jimenez, C. S. (2015). Estado legal mundial del cadmio en cacao (*Theobroma cacao*). *Producción + Limpia*, 1(10), 3-4, http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552015000100009#:~:text=La%20Norma%20TC3%A9cnica%20Obligatoria%20para,como%20Pb%202%20mg%20FKg.

- Lafont, J., Páez, M., & Lans, E. (2011). Composición fisicoquímica de la semilla y del aceite de la semilla del Canime (*Copaifera officinalis* L). *Información tecnológica*, 22(3), 19-26. [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642011000300004#:~:text=La%20composici%C3%B3n%20quimica%20del%20aceite,%25%2C%20behenico%20\(1.99%25\)%2C](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642011000300004#:~:text=La%20composici%C3%B3n%20quimica%20del%20aceite,%25%2C%20behenico%20(1.99%25)%2C).
- Mäkinen, K. (2000). ¿Can the pentitol-hexitol theory? *Medical Hypotheses*, 54(4), 603-613 <https://doi.org/10.1054/mehy.1999.0904>.
- MINISTERIO DE DESARROLLO AGRARIO Y RIEGO (MIDAGRI). (2022). *Observatorio de COMMODITIES CACAO abril-septiembre 2021-BOLETÍN DE PUBLICACIÓN TRIMESTRAL*, (02 y 03), 4-19. visto el 23/02/2023. disponible <https://www.gob.pe/institucion/midagri/informes-publicaciones/1924480-commodities-trimestral-2021>.
- Ministerio de Salud (MINSA). (05 de 09 de 2023). *REUNIS - Repositorio Único Nacional de Información en Salud*. Obtenido de Salud Bucal: https://www.minsa.gob.pe/reunis/data/tablero_salud-bucal.asp
- Miranda, F., de Oliveira, J., Alves, A., Alves, R., Fernandes, T., Patricia, A., . . . Pierre, J. (2021). Efecto del aceite esencial de copaíba (*Copaifera officinalis* L.) como conservante natural sobre la oxidación y vida útil de hamburguesas de carnero. *PLOS ONE*, 16(3).<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248499>.
- Moromi, H., Ramos, D., Villavicencio, J., Martinez, E., Mendoza, A., Chavez, E., & Quispe, A. (2018). Estudio in vitro del Efecto Antibacteriano de la Oleorresina de *Copaifera reticulata* y el Aceite Esencial de *Origanum majoricum* Frente a *Streptococcus mutans* y *Enterococcus Faecalis* Bacterias de Importancia en Patologías Orales. *J. Odontostomat*, 12(4), 355-361. Obtenido de <https://www.scielo.cl/pdf/ijodontos/v12n4/0718-381X-ijodontos-12-04-00355.pdf>.
- Negrón, M. (2018). *Microbiología Estomológica fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamerica S.A.C.F.
- Nielsen, D., Jespersen, L., Crafa, M., & Jakobsen, M. (2012). The Microbiology of Cocoa Fermentation. En V. Watson, R. Preedy, & S. Zibadi, *Chocolate in Health and Nutrition* (págs. 39-47). Humana Press. https://www.researchgate.net/publication/282494095_Chocolate_in_Health_and_Nutrition.
- Ojeda, J., Oviedo, E., & Salas, L. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *Rev. CES Odont*, 26(1), 44-56. <http://www.scielo.org.co/pdf/ceso/v26n1/v26n1a05.pdf>.
- Organización Internacional del Cacao. (22 de febrero de 2022). *Febrero 2022 Boletín Trimestral de Estadísticas Cacaoteras*. Obtenido de International Cocoa Organization: Home. visto February 27, 2023, from <https://www.icco.org/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (18 de 11 de 2022). *Organización Mundial de la Salud* (. Obtenido de La OMS destaca que el descuido de la salud bucodental afecta a casi la mitad de la población mundial: <https://www.who.int/es/news/item/18-11-2022-who-highlights-oral-health-neglect-affecting-nearly-half-of-the-world-s-population>

- Pasquel, J. L., Fernandez, F., Dos Santos, P., Rezende, C., Sartorattoc, A., Queiroga, C., & Martinez, J. (2018). Producción de partículas de oleorresina de copaiba (Copaifera officinalis) mediante extracción de emulsiones con fluidos supercríticos. *La revista de fluidos supercríticos*, (140), 2, <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.07.021>.
- Peña, C. (24 de 12 de 2022). *El Peruano*. Obtenido de La salud bucal también debe ser una prioridad: visto el 22/09/2023 en <https://www.elperuano.pe/noticia/199688-la-salud-bucal-tambien-debe-ser-una-prioridad>
- Pirouzian, H., Hadi, S., & Azadmard, S. (2018). *Effect of maltitol and xylitol combination on physicochemical properties of sucrose-free chocolate*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/331486648_EFFECT_OF_MALTITOL_AND_XYLITOL_COMBINATION_ON_PHYSICOCHEMICAL_PROPERTIES_OF_SUCROSE-FREE_CHOCOLATE: El Simposio Internacional sobre Reología y Textura de los Alimentos.
- Saavedra, L. (23 de 07 de 2021). *Procesamiento del chocolate*. Obtenido de Instituto Tecnológico de la Producción: <https://www.itp.gob.pe/nuestros-cite/agroindustrial-y-alimentario/cite-agro-huallaga/>
- Schuhmacher, K., Forsthofer, L., Rizzi, S., & Teubner, C. (1998). *El gran libro del chocolate: Información práctica sobre pastelería, confitería, postres y bebidas*. Lectorum Publications. <https://www.amazon.com/-/es/Schuhmacher-Karl/dp/8424123964>.
- Schüke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., & Wesker, K. (2007). *Prometheus. Texto y atlas de anatomía. T.3, Cabeza y neuroanatomía*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- SIEA MIDAGRI. (2022). *Perfil productivo y competitivo de los principales cultivos del sector*. Obtenido de SIEA - BI: Visto March 8, 2023, from https://siea.midagri.gob.pe/portal/siea_bi/index.html
- Sierra y selva exportadora. (s.f.). *Programa Nacional del Cacao. Programa Nacional del Cacao*. Obtenido de Sierra y selva exportadora: Retrieved March 3, 2023, from <https://www.sierraexportadora.gob.pe/programas/cacao/que-significa.php>
- Sirichai, S. (2022). *Descargar cacao en grano fermentado y fresco en la caja de madera gratis*. Obtenido de Vecteezy: Visto Marzo 28, 2023, from <https://es.vecteezy.com/foto/2923564-granos-de-cacao-fermentados-y-frescos-que-yacen-en-la-caja-de-madera>
- Sociedad Española de Medicina de Laboratorio. (03 de 11 de 2019). *Antibiograma*. Obtenido de visitado el 14/10/2023, <https://www.labtestsonline.es/tests/antibiograma>
- Talavera, R. E. (12 de Julio de 2023). Métodos avanzados en evaluación sensorial de alimentos.
- Tanzer, J., Livingston, J., & Thompson, Á. (2001). The Microbiology of Primary Dental Caries in Humans. *Journal of Dental education*, <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2001.65.10.tb03446.x> 1034.

- Tortora, G., & Derrickson, B. (2018). *Principios de Anatomía y Fisiología*. Madrid: Editorial Médica Panamerica.
- Velasquez, P. (2017). *Métodos Estadísticos para la Investigación en la Agronindustria*. Ayacucho: Imprenta Multiservicios Publigráf.
- Yaranga, K. (Julio de 2018). Microbiología General [Material de aula]. *Evaluación de agentes antimicrobianos*. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS	Organización mundial de la salud
MIDAGRI	Ministerio de desarrollo agrario y riego
SIEA	Portal de Ministerio de desarrollo agrario y riego
NTP	Norma técnica peruana
ppm	Partes por millón en una solución (mg/kg)
ANOVA	Análisis de varianza
Ch	chocolate
mg	Miligramos
kg	kilogramos
mm	milímetros
cm	centímetro
mL	mililitros
L	litro

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES
¿En qué medida el efecto de la concentración del aceite de copaiba en chocolate edulcorado con xilitol afectará en sus características sensoriales e inhibición microbiana de <i>Streptococcus mutans</i> causante de la caries dental? PROBELMAS ESPECIFICOS ¿Cuál será la proporción de aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) en chocolate edulcorado con xilitol que tiene el mayor efecto inhibitorio del crecimiento de <i>Streptococcus mutans</i> causante de la caries?	OBJETIVO GENERAL - Elaborar chocolate edulcorado con xilitol y adición del aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) para evaluar su efecto en sus características sensoriales e inhibición microbiana OBJETIVOS ESPECIFICOS - Establecer la concentración de aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) en chocolate edulcorado con xilitol que tenga el mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano (<i>Streptococcus mutans</i>) - Establecer la proporción de aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) en chocolate edulcorado con xilitol que tenga el mínimo efecto sensorial en el producto final - Formular un chocolate edulcorado con xilitol con diferentes concentraciones de aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) con capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano	HIPÓTESIS GENERAL - Es posible elaborar chocolate edulcorado con xilitol y adición del aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) para evaluar su efecto en sus características sensoriales e inhibición microbiana (<i>Streptococcus mutans</i>) causante de la caries dental HIPÓTESIS ESPECIFICOS - Es posible establecer la concentración de aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) en chocolate edulcorado con xilitol que tenga el mayor efecto inhibitorio del crecimiento microbiano (<i>Streptococcus mutans</i>) - Es posible establecer la proporción de aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) en	Variable independiente - Concentración de aceite de copaiba en el chocolate Indicadores Concentración de aceite esencial de copaiba en el chocolate Niveles 80 ppm, 100 ppm y 120 ppm Variable dependiente - Inhibición microbiana - Atributos sensoriales Indicadores - Halo de inhibición - Color, olor, sabor

Continúa

Continuación

• ¿Cuál será la proporción de aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) copaiba en chocolate edulcorado con xilitol que tiene el mínimo efecto sensorial en el producto final? • ¿Cuál será la concentración del aceite de copaiba en chocolate edulcorado con xilitol que tenga mayor capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano (<i>Streptococcus mutans</i>) y que tenga características sensoriales adecuadas para el consumidor?	(<i>Streptococcus mutans</i>) y características sensoriales adecuadas para el consumidor.	chocolate edulcorado con xilitol que tenga el mínimo efecto sensorial en el producto final • Se puede formular un chocolate edulcorado con xilitol con diferentes concentraciones de aceite de copaiba (<i>Copaifera officinalis</i>) con capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano (<i>Streptococcus mutans</i>) y características sensoriales adecuadas para el consumidor.	
---	--	---	--

ANEXOS

Anexo 1: Instrumento para la evaluación sensorial

Prueba de aceptabilidad						
Edad:	Sexo:					
Por favor enjuague su boca con agua antes de empezar. Por favor pruebe las cuatro muestras de productos presentados, empezando en el orden presentado, de izquierda a derecha. Usted puede beber agua tanto como desee. Usted puede probar nuevamente las muestras una vez que haya terminado de probar todas las que se presentan. Asigne un orden de preferencia a los productos presentados usando las siguientes categorías:						
Me disgusta extremadamente 1	Me disgusta mucho 2	Me disgusta un poco 3	Ni me gusta ni me disgusta 4	Me gusta poco 5	Me gusta mucho 6	Me encantó 7
Producto (chocolate)	Color	Olor	Sabor			
A= 0 ppm						
B = 80 ppm						
C = 100 ppm						
D = 120 ppm						
Gracias por su participación						

ANEXO 2

Arreglo diseño bloque completo al azar de evaluación sensorial

BLOQUE	Aspectos evaluados											
	COLOR				OLOR				SABOR			
Tratamientos	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
1	7	6	6	6	7	5	5	4	6	5	4	4
2	5	5	6	6	7	6	6	7	6	5	5	7
3	7	6	5	5	7	6	5	5	5	5	5	6
4	6	6	5	6	7	7	5	4	5	6	5	7
5	6	6	6	6	6	5	6	5	5	7	5	5
6	6	6	6	6	6	5	4	4	4	5	6	7
7	6	5	5	6	7	6	5	5	3	6	6	5
8	6	5	5	5	7	6	6	5	4	4	3	5
9	6	6	5	5	7	6	5	5	4	6	6	5
10	6	6	6	6	6	5	6	6	5	6	7	6
11	5	5	6	6	5	5	4	6	5	6	6	7
12	6	6	6	6	6	6	6	6	5	6	6	7
13	4	5	3	6	1	3	6	6	2	3	5	5
14	4	4	4	4	1	3	4	6	1	2	3	5
15	4	6	4	5	3	4	4	4	1	6	7	5
16	6	6	6	6	5	5	5	5	3	5	6	5
17	6	6	6	6	4	5	4	5	5	6	7	7
18	6	5	5	5	5	6	6	5	6	6	5	5
19	7	7	7	7	5	5	6	7	4	5	5	7
20	4	7	6	7	5	3	5	5	3	5	6	4
21	6	6	6	6	6	6	6	6	3	4	5	6
22	6	6	7	5	6	6	5	5	3	4	4	5
23	6	6	6	6	6	6	5	5	4	5	5	5
24	5	6	5	7	5	7	6	6	6	7	7	7
25	5	5	6	6	5	6	6	6	5	2	7	7
26	7	7	7	7	6	6	6	6	2	2	3	5
27	5	5	5	6	6	5	5	6	5	5	5	7
28	5	5	6	5	5	5	5	4	5	2	4	5
29	6	6	6	6	6	5	5	5	6	5	5	5
30	6	6	5	5	5	6	6	6	5	6	4	4
31	6	6	6	6	5	6	5	5	6	7	7	7
32	7	7	6	5	4	6	7	7	5	6	7	6
33	6	6	6	6	5	4	5	5	7	6	6	4
34	6	6	6	6	4	4	5	5	5	3	6	4
35	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	7	7
36	6	6	6	6	5	5	5	5	5	6	6	5
37	6	6	5	5	6	6	6	6	5	6	3	5

Continuación

38	5	6	4	5	5	5	4	5	6	5	4	6
39	6	6	6	6	5	5	4	6	5	5	4	6
40	6	5	6	5	6	4	6	5	6	3	6	3
41	5	6	6	6	6	6	6	7	6	6	7	7
42	5	5	5	5	4	5	4	4	4	6	5	7
43	7	7	7	7	6	6	7	7	5	3	6	7
44	7	7	7	7	6	6	7	7	5	3	6	7
45	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6
46	6	6	6	6	7	7	7	7	6	6	6	7
47	5	5	5	5	6	6	6	6	7	6	5	4
48	2	3	4	6	3	5	6	6	3	5	6	6
49	7	4	4	7	7	4	6	3	1	5	7	7
50	6	6	6	7	6	7	7	5	6	5	7	6

Nota. Se muestra los tratamientos, también el testigo que no tiene aceite de copaiba, identificado como A, dónde, A =0 ppm, B=80 ppm, C=100 ppm, D=120 ppm, evaluado con 50 jueces.

ANEXO 3

PROCESO DE ELABORACIÓN DE CHOCOLATE

Fotografía 1

Recepción de cacao en grano seco



Fotografía 2

Evaluación de humedad del cacao en grano



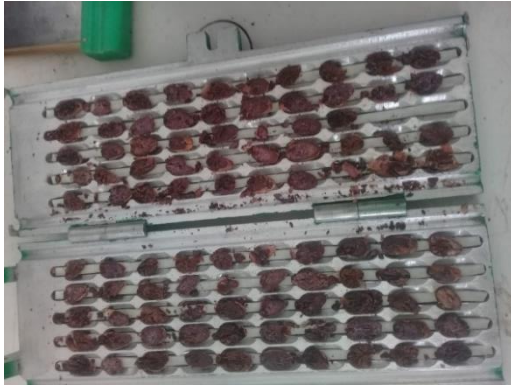
Fotografía 3

Medición de nivel de nivel de fermentación



Fotografía 4

Evaluación de nivel de fermentación de cacao



Nota: Se cuenta el número de bien fermentado, violetas, pizarrosas, sobre fermentados y finalmente se realiza una 2 evaluación, siendo en total la evaluación de 100 granos, el número de los tipos de grano cacao corresponde al porcentaje.

Fotografía 5

granos de cacao tostado



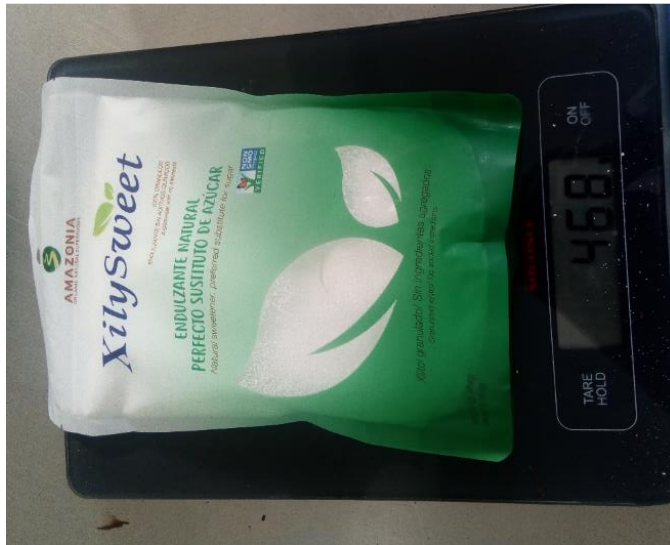
Fotografía 6

Nibs de cacao descascarillado manualmente



Fotografía 7

Insumo Xilitol



Fotografía 8

Pasta de cacao (licor de cacao)



Fotografía 9

Mezclado de insumos en refinadora



Fotografía 10

Micrómetro



Nota: para medición de tamaño de partícula

Fotografía 11

Chocolate refinado



Fotografía 12

Chocolate al 70% de cacao



Nota: chocolate que tiene 14 micras, será temperado y moldeado

Fotografía 13

Dosificado de aceite de copaiba



Nota: en concentraciones de 80ppm, 100ppm, 120ppm, se añade en proceso de temperado que tiene un tiempo de duración de 10 min

Fotografía 14

Chocolate moldeado



Chocolate moldeado

Fotografía 15

Moldeado de chocolates para la evaluación sensorial



Fotografía 16

chocolates del tratamiento envasados



Nota: se muestra todos los tratamientos para evaluación sensorial y antibiograma.

ANEXO 4

PROCESO PARA LA EVALUACIÓN DE TAMAÑO DE HALO DE INHIBICIÓN MICROBIANA

Fotografía 17

Materiales e insumos



Fotografía 18

Insumos y materiales para escala Mc Farland



Fotografía 19

Medición de la masa de medio de cultivo



Fotografía 20

Cultivo estándar ATCC 25175 *estreptococcus mutans*



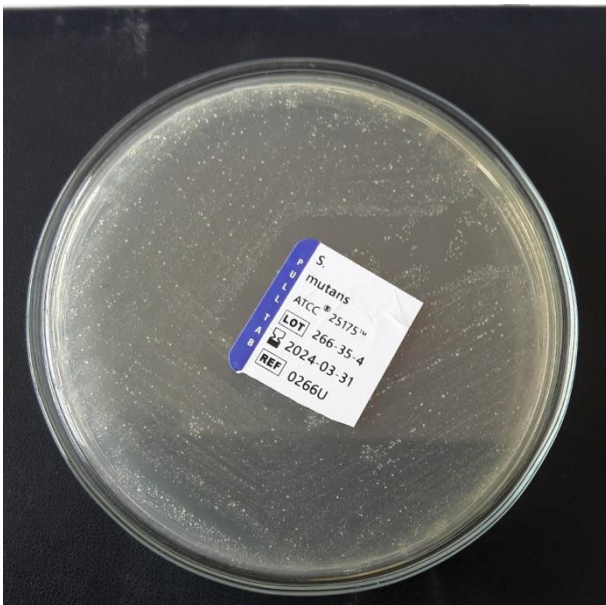
Fotografía 21

Medios de cultivo



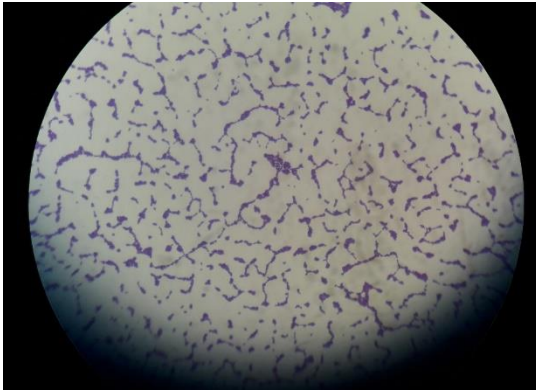
Fotografía 22

Colonias de *Estreptococcus mutans* en placa de agar TSY



Fotografía 23

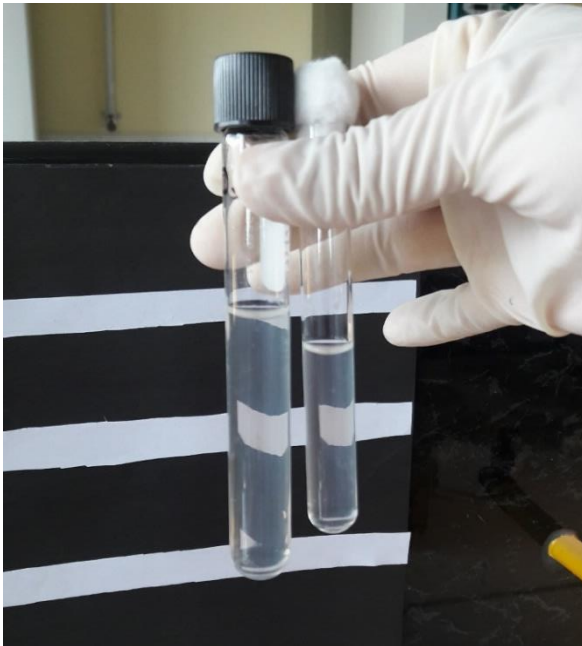
*Coloración gram de colonias de *Streptococcus mutans**



Nota: Con la finalidad de diferenciar el gram +

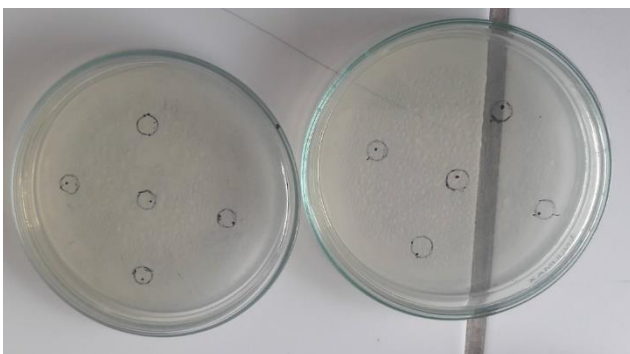
Fotografía 24

Comparación visual de la dilución de colonias con 0,5 Mc Farland



Fotografía 25

*Designación de hoyo (diámetro 6mm*4mm altura) para los tratamientos*



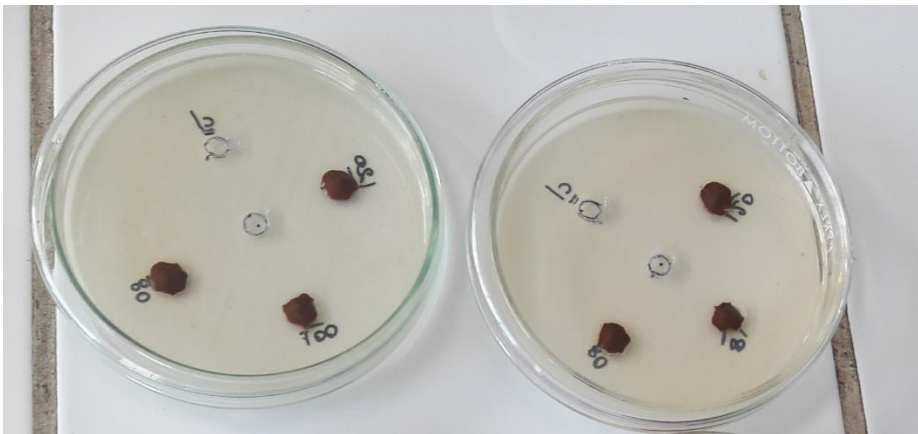
Fotografía 26

Sembrado en placa (agar muller Hinton) por agotamiento de superficie con hisopo estéril



Fotografía 27

Incorporación de chocolate, clorhexidina, agua destilada, en cada hoyo en cantidad de 150µL



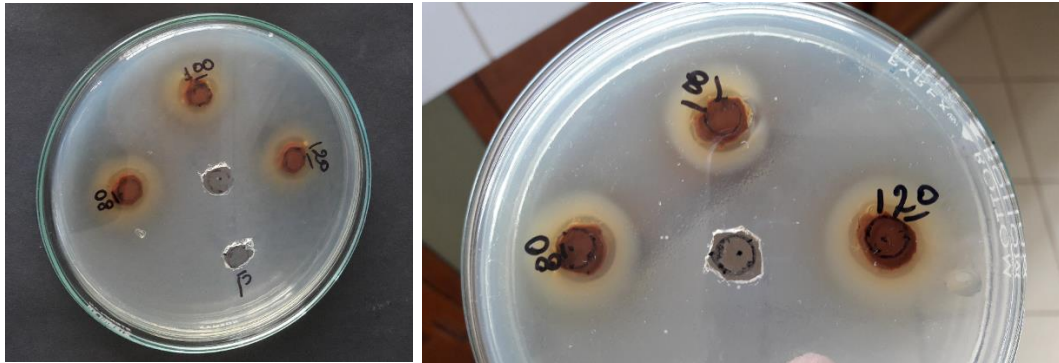
Fotografía 28

Incubación de las placas a 37°C



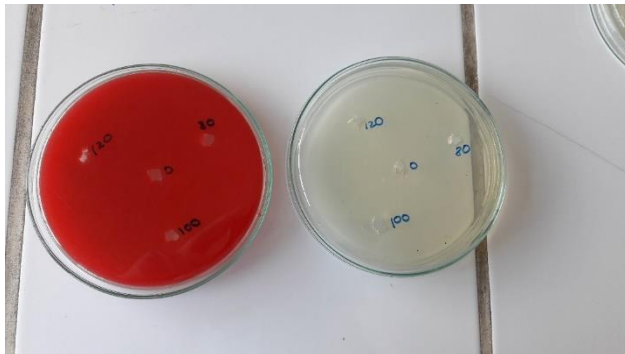
Fotografía 29

Lectura de tamaño de halo de inhibición microbiana



Fotografía 30

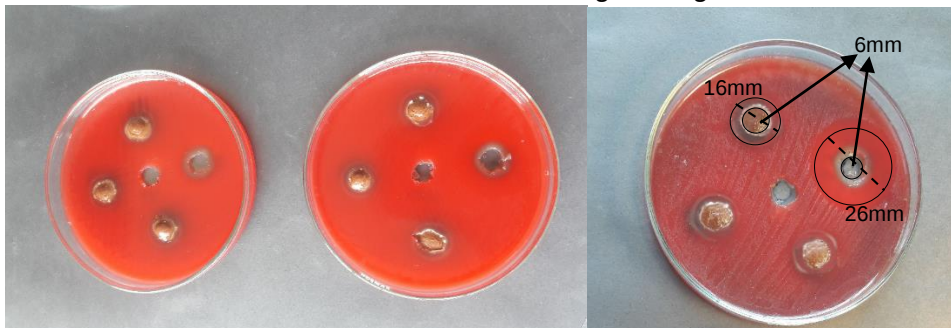
preparación de agar sangre



Nota: se realizó con el fin de medir de manera exacta el tamaño de halo, debido al halo de difuminación vs halo de inhibición microbiana que se confunde en el Agar Muller Hinton

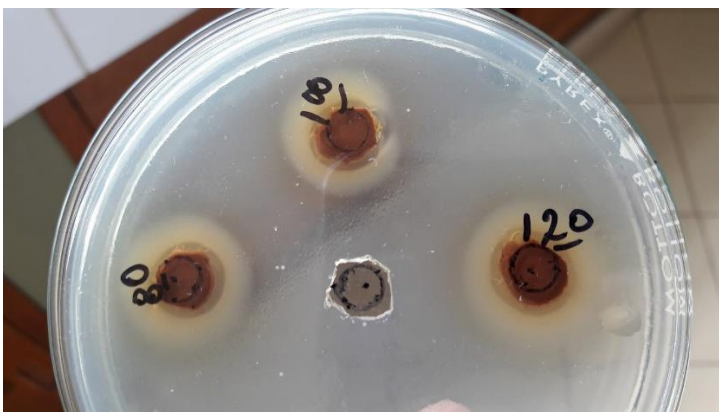
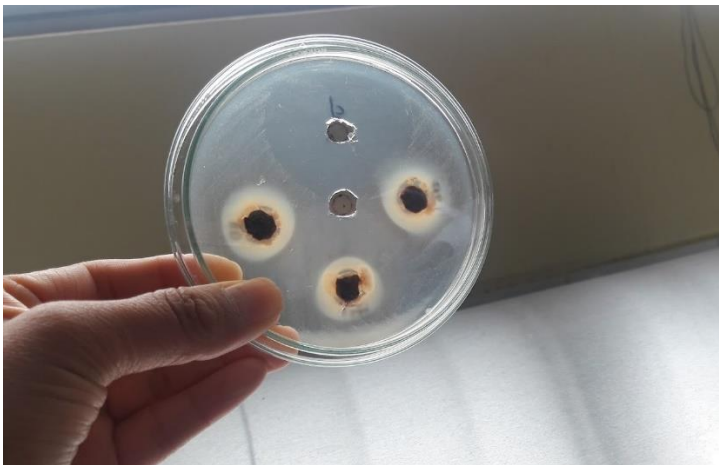
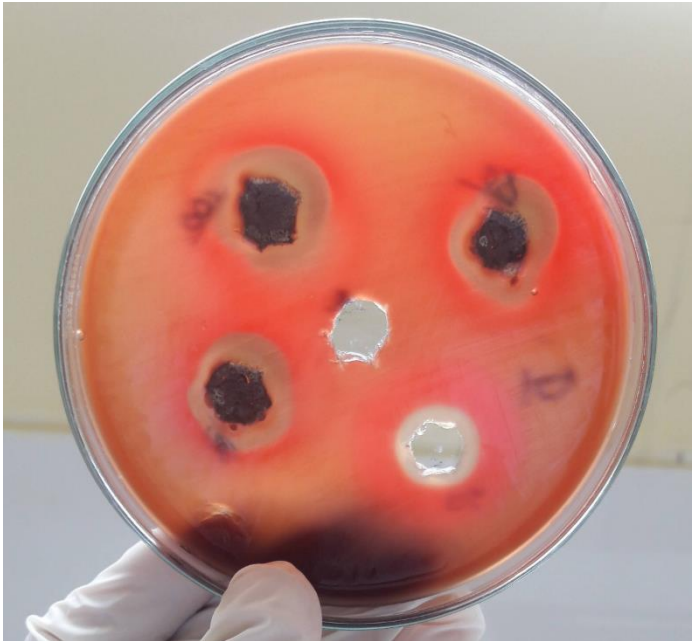
Fotografía 31

Lectura de halo de inhibición microbiana en agar sangre



Fotografía 32

Vista posterior del tamaño de halo de inhibición microbiana en agar sangre y agar MH



Fotografía 33

Vista del tamaño de halo de los tratamientos sin clorhexidina como blanco



Resultados de las evaluaciones para halo de inhibición microbiana, con los 3 tratamientos y tres testigos.

Repeticiones	Clorhexidina 0.12%	Agua destilada	00 ppm	80 Ppm	100 ppm	120 ppm
1	25 mm	6 mm	6 mm	13 mm	13 mm	13 mm
2	24 mm	6 mm	6 mm	13 mm	14 mm	14 mm
3	26 mm	6 mm	6 mm	15 mm	16 mm	17 mm
4	28 mm	6 mm	6 mm	12 mm	13 mm	16 mm
5	28 mm	6 mm	6 mm	14 mm	16 mm	16 mm
6	26 mm	6 mm	6 mm	14 mm	14 mm	15 mm
7	27 mm	6 mm	6 mm	11 mm	11 mm	13 mm
8	25 mm	6 mm	6 mm	11 mm	13 mm	14 mm
9	26 mm	6 mm	6 mm	13 mm	13 mm	15 mm
10	26 mm	6 mm	6 mm	13 mm	12 mm	13 mm
11	25 mm	6 mm	6 mm	16 mm	15 mm	17 mm
12	26 mm	6 mm	6 mm	15 mm	15 mm	17 mm

Nota: El resultado de 6mm del agua destilada y chocolate sin copaiba, son en diámetro del disco de 6mm por considerar en los otros datos

ANEXO 5

RESULTADOS DE EVALUACIÓN DE METALES PESADOS Y ENSAYOS FISICOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS



CERTECC SAC
Organismo de Inspección y Laboratorio

INFORME DE ENSAYO N° IE-RS-0410-001-2023

Emitido en Abancay, el 04 de octubre del 2023

1. DATOS DEL SOLICITANTE

N° ORDEN DE TRABAJO	001.RS260923-OE
EMPRESA	MARLENI MARTÍNEZ HUILLCA
RUC	--
DIRECCIÓN	URB MARISCAL CÁCERES MZ.N LT 31

2. DATOS DEL SERVICIO

PRODUCTO	CHOCOLATE CON XILITOL
ASUNTO	Análisis Microbiológicos / Análisis Fisicoquímicos
CANTIDAD DE MUESTRAS	4 unidades de 50 g
REFERENCIA DEL LABORATORIO	FQ-01/ FQ-02

3. DATOS DEL MUESTREO Y/O RECEPCIÓN DE MUESTRA

LUGAR Y FECHA DE TOMA DE MUESTRA	Muestra proporcionada por el cliente. (1)
MÉTODO DE TOMA DE MUESTRA	---
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO	Bolsa de aluminio x 200 g / Temperatura Ambiente
LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN	Av. Ayacucho Nro. 51N Urb. Patibamba Baja – Abancay, 26 de setiembre del 2023
FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS	26 de setiembre del 2023
FECHA DE TÉRMINO DE ANÁLISIS	03 de octubre del 2023

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS

ENSAYOS	UNIDADES	RESULTADOS FQ-01
Manteca de cacao	%	41.89
Extracto seco magro de cacao	%	29.16
Total extracto seco de cacao	%	71.05
Plomo	mg/kg	<0.02 (*)
Cadmio	mg/kg	<0.02 (*)

(*) L.D: Límite de Detección: <0.02 mg/kg

4.2. ANÁLISIS FISICOQUÍMICOS NUTRICIONALES

ENSAYOS	UNIDADES	RESULTADOS FQ-02
Humedad	%	0.9
Proteína	g/100g	15.56
Carbohidratos totales	g/100g	28.76
Fibra	g/100g	10.82
Grasa	g/100g	41.06
Ceniza	g/100g	2.90
Energía	kcal/100g	546.26

4.3. MÉTODOS DE ENSAYO

ENSAYOS	REFERENCIA O NORMA
Manteca de cacao	AOAC 963.15 a 1.973, grasa de cacao en productos - Extracción Soxhlet Met
Extracto seco magro de cacao	AOAC Official Method 931.05 Cacao Mass (Fat-Free) of Chocolate Liquor
Total extracto seco de cacao	AOAC 931.04 19th. Ed(2012) . Loss on Drying (Moisture) in cacao products
Plomo, cadmio	AOAC 999.11 18th. Ed. 2005. Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron, Arsenic, and Zinc in Foods.
Humedad	AOAC 977.10-1979, Moisture in Cacao Products - Karl Fischer Meth
proteína	AOAC Official Method 970.22, Determinación de Nitrógeno total en productos de Cacao.
Carbohidratos totales	Cálculo interno.
Fibra	AOAC 2009.01-2009, Fibra dietética total en los alimentos.
Grasa	AOAC Official Method 963.15 para Grasa en productos de Cacao
Ceniza	AOAC 972.15-1974, Cenizas de productos del cacao
Energía	Cálculo interno.



CERTECC SAC
Organismo de Inspección y Laboratorio

INFORME DE ENSAYO N° IE-PT-1002-001-2024

Emitido en Abancay, el 10 de febrero del 2024

1. DATOS DEL SOLICITANTE

N° ORDEN DE TRABAJO : 001.PT030224-OE
EMPRESA : MARLENI MARTÍNEZ HUILLCA
RUC : --
DIRECCIÓN : URB MARISCAL CÁCERES MZ.N LT 31

2. DATOS DEL SERVICIO

PRODUCTO : CHOCOLATE CON XILITOL
ASUNTO : Análisis Microbiológicos
CANTIDAD DE MUESTRAS : 4 unidades de 50 g
REFERENCIA DEL LABORATORIO : FQ-01/ FQ-02

3. DATOS DEL MUESTREO Y/O RECEPCIÓN DE MUESTRA

LUGAR Y FECHA DE TOMA DE MUESTRA : URB MARISCAL CÁCERES MZ.N LT 31 / 2024-02-01⁽¹⁾
MÉTODO DE TOMA DE MUESTRA : Según procedimiento interno: SGI-PR-10, MUESTREO Y TOMA DE MUESTRA.
PRESENTACIÓN DEL PRODUCTO : Bolsa de aluminio x 200 g / Temperatura Ambiente
LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN : Av. Ayacucho Nro. S/N Urb. Patibamba Baja – Abancay, 03 de febrero del 2024
FECHA DE INICIO DE ANÁLISIS : 03 de febrero del 2024
FECHA DE TÉRMINO DE ANÁLISIS : 10 de febrero del 2024

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

ENSAYOS	UNIDADES	RESULTADOS MB-01				
		N1	N2	N3	N4	N5
Recuento de Mohos	UFC/g	<10*	<10*	<10*	<10*	<10*
Recuento de Escherichia coli	UFC/g	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a	<10 ^a
Detección de Salmonella spp	Salmonella spp/25g	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

* Número estimado, * Número estimado, UFC: Unidades Formadoras de Colonias

4.1. MÉTODOS DE ENSAYO

ENSAYOS	REFERENCIA O NORMA
Recuento de Mohos	ICMSF Microorganismos de los Alimentos. Su significado y métodos de enumeración. Pág. 165-167 2da Ed. Reimpresión 2000 1983 Método de Recuento de Levaduras y Mohos por siembra en placa en todo el medio
Recuento de Escherichia coli	AOAC 991.14 Chapter 17, Subchapter 3; 17.3.04 - 22nd Edition. Coliform and Escherichia coli Counts in Foods. Dry Rehydratable Film (Petrifilm E. coli/Coliform Count Plate and Petrifilm Coliform Count Plate Method)
Detección de Salmonella spp	ISO 6579-1:2017/ Amd.1:2020 (excepto 9.3.3 y 9.4.3 y anexo D) 2017 Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella -- Part 1: Detection of Salmonella spp.

5. OBSERVACIONES

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA.
- ⁽¹⁾ Los resultados se aplican a la muestra cómo se recibió.

CERTIFICACIONES E INSPECCIONES
TECNICAS CONSULTORES
Ing. Candy Olaya Caspales Orosco
CIP. N° 280238
JEFE DE LABORATORIO

ANEXO 6 EVALUACIÓN DE ATRIBUTOS SENSORIALES

Fotografía 34

Bandeja de evaluación sensorial de los tratamientos



Nota: se muestra los 3 tratamiento más el blanco(testigo) a evaluar

Fotografía 35

Espacio de evaluación de 1 juez



Nota: se muestra la bandeja con los tratamientos y el instrumento de evaluación

Fotografía 36

Jueces en plena evaluación sensorial



ANEXO 7

EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE RESULTADOS

Resumen estadístico para inhibición microbiana

<i>TRATAMIENTOS</i>	<i>Recuento</i>	<i>Promedio</i>	<i>Desviación Estándar</i>
Ch-100 ppm	12	13.75	1.54479
Ch-120 ppm	12	15.0	1.59545
Ch-80 ppm	12	13.3333	1.557
Clorhexidina al 0.12%	12	26.0	1.20605

Tabla de Medias para halo inhibición por tratamientos con intervalos de confianza del 95.0%

<i>TRATAMIENTOS</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
Ch-100 ppm	12	13.75	13.207	14.293
Ch-120 ppm	12	15.0	14.457	15.543
Ch-80 ppm	12	13.3333	12.7903	13.8764
Clorhexidina al 0.12%	12	26.0	25.457	26.543

Tabla de contraste entre los tratamientos

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Ch-100 ppm - Ch-120 ppm	*	-1.25	1.08605
Ch-100 ppm - Ch-80 ppm		0.416667	1.08605
Ch-100 ppm – Clorhexidina 0.12%	*	-12.25	1.08605
Ch-120 ppm - Ch-80 ppm	*	1.66667	1.08605
Ch-120 ppm - Clorhexidina 0.12%	*	-11.0	1.08605
Ch-80 ppm - Clorhexidina 0.12%	*	-12.6667	1.08605

* indica una diferencia significativa.

Resumen Estadístico para SABOR

Recuento	200 evaluaciones
Promedio	5.225
Desviación Estándar	1.37617
Coeficiente de Variación	26.3382%
Mínimo	1.0
Máximo	7.0
Rango	6.0

Análisis de varianza para COLOR

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
Chocolates	1.455	3	0.485	1.27	0.2881
BLOQUE	96.205	49	1.96337	5.13	0.0000
RESIDUOS	56.295	147	0.382959		
TOTAL (CORREGIDO)	153.955	199			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Resumen estadístico para COLOR

<i>Nivel</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>
MEDIA GLOBAL	200	5.765	0.87957
Chocolates			
A =00 ppm	50	5.76	1.00122
B = 80 ppm	50	5.78	0.840068
C = 100ppm	50	5.64	0.920514
D =120ppm	50	5.88	0.746147

Nota: Los partes por millón (ppm) corresponde al aceite de copaiba en el chocolate (mg aceite de copaiba/kg de chocolate)

Análisis de varianza para OLOR

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
CHOCOLATES	0.22	3	0.0733333	0.10	0.9624
BLOQUE	124.82	49	2.54735	3.32	0.0000
RESIDUOS	112.78	147	0.767211		
TOTAL (CORREGIDO)	237.82	199			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Resumen estadístico para OLOR

<i>Nivel</i>	<i>Recuento</i>	<i>Media</i>	<i>Desviación Estándar</i>
MEDIA GLOBAL	200	5.47	1.0932
CHOCOLATES			
A =00 ppm	50	5.46	1.38814
B = 80 ppm	50	5.42	1.03194
C = 100ppm	50	5.5	0.931315
D =120ppm	50	5.5	0.994885

Nota: Los partes por millón (ppm) corresponde al aceite de copaiba en el chocolate (mg aceite de copaiba/kg de chocolate)



CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD

El Director de la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, hace CONSTAR:

Que, la Srta. Marleni MARTINEZ HUILLCA egresada de la Escuela de Formación Profesional de Ingeniería en Industrias Alimentarias ha remitido, con el aval y por intermedio de su asesor el Ing. Julio Fernando Pérez Sáez, la Tesis: *"Efecto de la adición de aceite de copaiba (Copaifera officinalis) sobre las características sensoriales y capacidad de inhibición microbiana de chocolate edulcorado con xilitol"*; y se precisa con el Informe de Originalidad de Turnitin, que el índice de similitud del trabajo es de 17% y que se ha generado el Recibo digital que confirma el Depósito que el trabajo ha sido recibido por Turnitin con fecha marzo 16 de 2024 e Identificador de la Entrega N° 231933384.

Se expide la presente, para los fines pertinentes.

Ayacucho, marzo 19 de 2024.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA
E.F.P. DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

Ing° CIP Antonio L. Matos Alejandro
DIRECTOR

c.c. : Archivo digital.
Constancia N° 098

Efecto de la adición de aceite de copaiba (*Copaifera officinalis*) sobre las características sensoriales y capacidad de inhibición microbiana de chocolate edulcorado con xilitol

por MARLENI MARTINEZ HUILLCA

Fecha de entrega: 16-mar-2024 08:13a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2321933384

Nombre del archivo: Martinez_Marleni_Tesis_Final_Marzo_2024.pdf (1.08M)

Total de palabras: 21320

Total de caracteres: 106014

Efecto de la adición de aceite de copaiba (Copaifera officinalis) sobre las características sensoriales y capacidad de inhibición microbiana de chocolate edulcorado con xilitol

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%	17%	3%	7%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	idoc.pub Fuente de Internet	1%
2	dokumen.pub Fuente de Internet	1%
3	tesis.pucp.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.uladech.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	d2vmpwbfz8sj1e.cloudfront.net Fuente de Internet	1%
7	www.gob.pe Fuente de Internet	1%
8	cdn.www.gob.pe Fuente de Internet	1%

9	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1 %
10	Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS Trabajo del estudiante	1 %
11	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	1 %
12	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %
13	hub.unido.org Fuente de Internet	<1 %
14	repository.ean.edu.co Fuente de Internet	<1 %
15	edoc.pub Fuente de Internet	<1 %
16	documents.mx Fuente de Internet	<1 %
17	jcnaturals.com Fuente de Internet	<1 %
18	repositorio.inia.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
19	sepaloquecome.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
20	intra.uigv.edu.pe	

Fuente de Internet

<1 %

21

repositorio.unheval.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

22

repositorio.uap.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

23

hdl.handle.net

Fuente de Internet

<1 %

24

Submitted to Universidad Católica
Nordestana

Trabajo del estudiante

<1 %

25

webquery.ujmd.edu.sv

Fuente de Internet

<1 %

26

ciencia.lasalle.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

27

ria.utn.edu.ar

Fuente de Internet

<1 %

28

www.legiscomex.com

Fuente de Internet

<1 %

29

purl.org

Fuente de Internet

<1 %

30

es.scribd.com

Fuente de Internet

<1 %

31

www.ign.gob.pe

Fuente de Internet

<1 %

32

rpp.pe

Fuente de Internet

<1 %

33

Submitted to Universidad Nacional de Colombia

Trabajo del estudiante

<1 %

34

revistas.unipamplona.edu.co

Fuente de Internet

<1 %

35

peru21.pe

Fuente de Internet

<1 %

36

Submitted to Pontificia Universidad Catolica del Peru

Trabajo del estudiante

<1 %

37

tschudinlab.odoo.com

Fuente de Internet

<1 %

38

Submitted to Universidad Cientifica del Sur

Trabajo del estudiante

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

**UNSCH**FACULTAD DE INGENIERÍA
QUÍMICA Y
METALURGIA**ACTA DE SUSTENCIÓN DE LA TESIS PRESENCIAL:**

(Reglamento de grados y títulos, aprobado con RCU N° 314-2021-UNSCH-CU)

**“EFECTO DE LA ADICION DE ACEITE DE COPAIBA (*Copaifera officinalis*)
SOBRE LAS CARACTERISTICAS SENSORIALES Y CAPACIDAD DE
INHIBICION MICROBIANA DE CHOCOLATE EDULCORADO CON XILITOL”****Expositora: Marleni MARTINEZ HUILLCA**
Bachiller en Ingeniería en Industrias Alimentarias**Expediente N° 242846 Resolución Decanal N° 058-2024-UNSCH-FIQM/D Fecha: 31-01-20224**

En la Sala de Conferencias “Pedro VILLENA HIDALGO” de la Facultad de Ingeniería Química y Metalurgia, ubicada en la Ciudad Universitaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (H-121), siendo las dos de la tarde con cinco minutos del día viernes dos de febrero del año dos mil veinticuatro, se reunieron la Bachiller en Ingeniería en Industrias Alimentarias **Marleni MARTINEZ HUILLCA**, los Docentes Miembros del Jurado de Sustentación Ingenieros: Dr. Juan Carlos PONCE RAMIREZ, Mg. Julio Pablo GODENZI VARGAS y Mg. Edith Susan PILLACA MEDINA, bajo la Presidencia del Dr. Agustín Julián PORTUGUEZ MAURTUA (Decano de la FIQM), Mg. Julio Fernando PEREZ SAEZ (Docente Asesor de la Tesis), el Mg. Fredy Rober PARIONA ESCALANTE (Secretario-Docente) y el público asistente.

Acto seguido, el Presidente del Jurado de Sustentación dispuso que el Secretario Docente dé lectura a los antecedentes tramitados para el presente Acto Público de Sustentación de la Tesis: **“EFECTO DE LA ADICION DE ACEITE DE COPAIBA (*Copaifera officinalis*) SOBRE LAS CARACTERISTICAS SENSORIALES Y CAPACIDAD DE INHIBICION MICROBIANA DE CHOCOLATE EDULCORADO CON XILITOL”**, presentado por la Bachiller **Marleni MARTINEZ HUILLCA**. A continuación, el Secretario-Docente procedió a dar lectura a la Resolución Decanal N° 058-2024-UNSCH-FIQM/D.

Luego, el Presidente del Jurado invitó a la Bachiller **Marleni MARTINEZ HUILLCA**, a pasar al estrado y exponer su trabajo de Tesis en un tiempo máximo de cuarenta y cinco minutos.

Terminada la exposición de la Bachiller, el Presidente invitó a los Señores Miembros del Jurado de Sustentación a que formulen sus preguntas y señalen sus observaciones, en el siguiente orden: Mg. Edith Susan PILLACA MEDINA, Mg. Julio Pablo GODENZI VARGAS y Dr. Juan Carlos PONCE RAMIREZ. Luego el Presidente invitó al Dr. Agustín Julián PORTUGUEZ MAURTUA para que, en su condición de Docente Asesor, se sirva levantar las observaciones del Jurado y efectuar las aclaraciones que considere conveniente.

Concluyó con esta etapa el Dr. Agustín Julián PORTUGUEZ MAURTUA, en su condición de Presidente.

**UNSCH**FACULTAD DE INGENIERIA
QUÍMICA Y
METALURGIA**ACTA DE SUSTENCIÓN DE LA TESIS PRESENCIAL:**

(Reglamento de grados y títulos, aprobado con RCU N° 314-2021-UNSCH-CU)

“EFECTO DE LA ADICION DE ACEITE DE COPAIBA (Copaifera officinalis) SOBRE LAS CARACTERISTICAS SENSORIALES Y CAPACIDAD DE INHIBICION MICROBIANA DE CHOCOLATE EDULCORADO CON XILITOL”**Expositora: Marleni MARTINEZ HUILLCA**
Bachiller en Ingeniería en Industrias Alimentarias**Expediente N° 242846 Resolución Decanal N° 058-2024-UNSCH-FIQM/D Fecha: 31-01-20224**

Culminada la etapa de preguntas, el Presidente del Jurado invitó a la Sustentante y al público para que se sirvan abandonar la Sala de Conferencias con la finalidad de permitir al Jurado de Sustentación deliberar sobre la evaluación a otorgar. Se alcanzó el siguiente resultado. **APROBADA POR UNANIMIDAD PROMEDIO QUINCE (15).**

Finalmente el Presidente del Jurado dispuso que se invite a la Sustentante y al público asistente a que se sirvan ingresar a la Sala de Conferencias, y anunció que la Bachiller **Marleni MARTINEZ HUILLCA**, ha resultado **APROBADA POR UNANIMIDAD**, y por lo tanto a partir de la fecha la Universidad y la Facultad cuenta con una flamante **INGENIERA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS** y le augura éxitos en su desempeño profesional.

Siendo las cuatro de la tarde con cinco minutos se dio por concluido el acto académico de Sustentación de Tesis. En fe de lo cual firmamos:


.....
Dr. Agustín Julián PORTUGUEZ MAURTUA
Presidente
.....
Dr. Juan Carlos PONCE RAMIREZ
Miembro
.....
Mg. Julio Pablo GODENZI VARGAS
Miembro
.....
Mg. Edith Susan PILLACA MEDINA
Miembro
.....
Mg. Fredy Rober PARIONA ESCALANTE
(Secretario Docente)