



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**MODELOS DE CALIBRACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE
INFRARROJO CERCANO PARA LA DETERMINACIÓN DE
CARBOHIDRATOS EN CHOCOLATE GOLOSINA.**

EVERARDO OVANDO LIEVANO

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2020



“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

**CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR
Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Everardo Ovando Lievano, alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección del Profesor Dr. Armando Guerrero Peña, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Modelos de calibración mediante espectroscopía de infrarrojo cercano para la determinación de carbohidratos en chocolate golosina y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

H. Cárdenas, Tabasco, a 15 de Junio de 2020.

Firma

Dr. Armando Guerrero Peña

Vo. Bo. Profesor Consejero

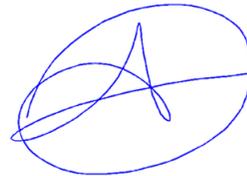
La presente tesis, titulada: “**MODELOS DE CALIBRACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN CHOCOLATE GOLOSINA**”, realizada por el alumno: **EVERARDO OVANDO LIEVANO**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. ARMANDO GUERRERO PEÑA

ASESORA:



DRA. EDITH HERNÁNDEZ NATAREN

ASESORA:



DRA. ADRIANA CONTRERAS OLIVA

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO, 25 DE JUNIO DE 2020

MODELOS DE CALIBRACIÓN MEDIANTE ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO CERCANO PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN CHOCOLATE GOLOSINA.

**Everardo Ovando Lievano. M.C.
Colegio de Postgraduados 2020**

RESUMEN

Para conocer la calidad de los chocolates se requiere de procedimientos químico-analíticos que permitan cuantificar sus características bioquímicas. Ya que su composición está en función de diferentes sustancias; y mucho de ello depende de la variedad y concentración de cacao con la que este sea elaborado.

Dichas propiedades tanto físicas como químicas, pueden determinarse por métodos convencionales que se encuentran pre-establecidos en las Normas Mexicanas (NMX-F-059-1964 y NMX-F-061-1964) para chocolate tipo amargo y de mesa, respectivamente. Estos métodos son lentos, tediosos y requieren uso de reactivos químicos que generan residuos contaminantes; y solo se obtiene información de los compuestos individuales o específicos de la muestra.

En años recientes el negocio de alimentos ha mostrado interés en utilizar la tecnología de infrarrojo cercano (NIR) para controlar el proceso de fabricación y el contenido de varios productos. El potencial que se le adjudica a este método es debido a que es una técnica rápida, no invasiva en la cual la muestra requiere una mínima o nula preparación, sin dejar de mencionar que reduce el error analítico y además no utiliza reactivos, es decir que no genera desechos químicos y es capaz de sustituir tecnologías como la cromatografía líquida y de gas, eficientemente.

El objetivo de esta investigación fue implementar la tecnología NIR para generar y evaluar el mejor modelo de calibración para estimar los carbohidratos y un grupo de atributos de calidad de los chocolates. Para comprobar la hipótesis de esta investigación se contó con 120 muestras de chocolate con concentraciones en intervalos de 10 %, que iban de 30-100 % cacao para cada una de las tres

variedades (forastero, trinitario y criollo) con 5 repeticiones. Se obtuvieron los espectros VIS-NIRS-SWIR de las muestras y juntos con los datos convencionales determinados, se generó un modelo de calibración a través de una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) y técnicas quimiométricas. El cual fue evaluado mediante calificadores estadísticos a través una validación interna y externa, obteniéndose valores de RPD y R, cercanos a la unidad. Lo cual los califica como excelentes modelos para la estimación.

Los resultados demuestran que con la interpretación quimiométrica de los espectros VIS-NIR-SWIR obtenidos directamente en las barras de chocolate, elaborados con distintas variedades de cacao y en diferentes concentraciones, es posible establecer modelos de predicción de los carbohidratos, el valor energético y proximales; lo cual tiene aplicaciones en sistema en tiempo real (*On line*).

Palabras clave: chocolate, análisis físico-químico, tecnología NIR, regresión PLS, validación interna y externa.

CALIBRATION MODELS BY NEAR INFRARED SPECTROSCOPY FOR THE DETERMINATION OF CARBOHYDRATES IN CHOCOLATE GOLOSIN.

Everardo Ovando Lievano. M.C.

Colegio de Postgraduados 2020

ABSTRACT

To know the quality of chocolates requires chemical-analytical procedures to quantify their biochemical characteristics. Since its composition depends on different substances, much of it depends on the variety and concentration of cocoa with which it is made.

These properties, both physical and chemical, can be determined by conventional methods that are preset in the Mexican Norms (NMX-F-059-1964 and NMX-F-061-1964) for bitter and table type chocolate, respectively. These methods are slow, tedious and require the use of chemical reagents that generate polluting residues; and information is obtained only from individual or specific compounds in the sample.

In recent years the food business has shown interest in using near infrared (NIR) technology to control the manufacturing process and the content of various products. The potential attributed to this method is due to the fact that it is a rapid, non-invasive technique in which the sample requires minimal or no preparation, not to mention that it reduces the analytical error and also does not use reagents, that is, it does not generate chemical waste and is able to replace technologies such as gas and liquid chromatography efficiently.

The objective of this research was to implement NIR technology to generate and evaluate the best calibration model that estimated carbohydrates and a group of quality attributes of chocolate. To prove the hypothesis of this research we counted on 120 chocolate samples with concentrations in intervals of 10 %, ranging from 30-100 % cocoa for each of the three varieties (foreign, trinitarian and creole) with 5 repetitions. The VIS-NIRS-SWIR spectra were obtained from the samples and together with the conventional data determined, a calibration model was generated through a partial least squares

regression (PLS) and chemometric techniques. It was evaluated by means of statistical qualifiers through an internal and external validation, obtaining values of RPD and R, close to the unit. Which qualifies them as excellent models for estimation.

The results show that with the chemometric interpretation of the VIS-NIR-SWIR spectra obtained directly from the chocolate bars, made with different varieties of cocoa and in different concentrations, it is possible to establish models of prediction of carbohydrates, energy value and proximal; which has applications in real time system (On line).

Keywords: chocolate, physical-chemical analysis, NIR technology, PLS regression, internal and external validation.

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a:

A mis padres, Danira y Everardo por su apoyo incondicional, cariño y enseñanzas. Por eso y muchas cosas más, gracias.

A mis hermanas, Ángela e Ivette, por creer siempre en mí y brindarme seguridad.

A mis primos, Oziel y Alexis por estar siempre cuando los necesité.

A mi sobrino, Ángel Mateo, por brindarme felicidad y entusiasmo con su nacimiento.

“Si nadie te garantiza el mañana el hoy se vuelve inmenso”.

Carlos Monsiváis

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Colegio de Postgraduados por brindarme las herramientas para mi formación profesional y el apoyo recibido en sus instalaciones.

A mi consejero, el Dr. Armando Guerrero Peña por compartir sus conocimientos, por el tiempo dedicado a este proyecto y su infranqueable disponibilidad.

A mi asesora, la Dra. Edith Hernández Nataren por la contribución al buen desarrollo de la investigación, por la oportunidad de contar con su conocimiento y experiencia en mi consejo particular.

A mi asesora, la Dra. Adriana Contreras Oliva por las aportaciones a esta investigación y su disponibilidad para colaborar.

Al Dr. Juan Manuel Zaldívar Cruz, por todas y cada una de las ocasiones en que me orientó, motivó y apoyó, y por brindarme su amistad durante esta etapa de mi formación.

A mi amiga, Isis Alejandra Martínez Hernández por el apoyo moral y emocional que me brindó durante todo este tiempo, además de su ayuda y acompañamiento en el laboratorio.

A mi amiga, Juana Olán Córdova y esposo por recibirme y hacerme sentir como en familia.

Al personal de Laboratorio Agroindustrial de Suelo, Plantas y Aguas (LASPA) por el apoyo en la realización de los análisis pertinentes de la investigación.

CONTENIDO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.2. OBJETIVOS	4
1.2.1. Objetivo General.....	4
1.2.2. Objetivos Específicos	4
1.3. HIPÓTESIS.....	4
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. CHOCOLATE	5
2.2. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS	8
2.2.1. Análisis proximal	8
2.2.2. Determinación de humedad	9
2.2.3. Determinación de cenizas	9
2.2.4. Determinación de grasa.....	10
2.2.5. Determinación de proteínas	11
2.2.6. Determinación de carbohidratos.....	11
2.3. TECNOLOGÍA DE INFRARROJO CERCANO (NIR).....	12
2.4. QUIMIOMETRÍA.....	15
2.5. EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DE DATOS.....	16
2.5.1. Tratamiento de datos espectrales	16
2.6. CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE.....	17
2.7. REGRESIÓN-PLS	19
2.8. VALIDACIÓN DEL MODELO	20
2.9. LITERATURA CITADA	22
CAPÍTULO III: VALOR NUTRACÉUTICO DE CHOCOLATES ELABORADOS CON TRES	

VARIEDADES DE CACAO DE TABASCO, MÉXICO.....	27
RESUMEN	27
ABSTRACT	28
3.1. INTRODUCCIÓN	29
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.2.1. Muestras.....	30
3.2.2. Pretratamiento de muestras	31
3.2.3. Análisis proximales	31
3.2.4. Análisis estadístico.....	31
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.3.1. Comparaciones entre los chocolates con 70 ± 3 % cacao de este estudio, y con los de Venezuela.....	33
3.3.2. Aporte nutracéutico de los chocolates con diferentes concentraciones de cacao.....	36
3.4. CONCLUSIONES	40
3.5. LITERATURA CITADA.....	41
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS, VALORES ENERGÉTICOS Y PROXIMAL DE CHOCOLATES PREPARADOS CON TRES VARIEDADES DE CACAO MEDIANTE ESPECTROCOPIA VIS-NIR-SWIR.	46
RESUMEN	46
ABSTRACT	47
4.1. INTRODUCCIÓN	48
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
4.2.1. Muestras.....	49
4.2.2. Pretratamiento de las muestras	49
4.2.3. Análisis proximales.....	49
4.2.4. Obtención de Espectros Combinados VIS-NIR-SWIR	50

4.2.5. Construcción y validación de los modelos	50
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
4.3.1. Validación de los modelos de calibración	53
4.4. CONCLUSIONES	61
4.5. LITERATURA CITADA.....	62
CAPÍTULO V. CONCLUSIÓN GENERAL	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representación esquemática de la estructura del chocolate (adaptada de Talbot, 2015).....	6
Figura 2.2. Espectrómetro NIR generalizado con tres partes básicas: lámpara, aislador de longitud de onda y detector (adaptado de McClure & Tsuchikawa, 2006).	13
Figura 3.1. Relación entre el contenido de cacao y grasas, en muestras de chocolates en concentraciones de 30 a 100 %, y de tres variedades de cacao de Tabasco, México.....	36
Figura 3.2. Relación entre el contenido de cacao y carbohidratos, en muestras de chocolates en concentraciones de 30 a 100 %, y de tres variedades de cacao de Tabasco, México.....	37
Figura 3.3. Relación entre el contenido de cacao y el contenido de energía, en muestras de chocolates en concentraciones de 30 a 100 %, y de tres variedades de cacao de Tabasco, México.....	38
Figura 3.4. Relación entre el contenido de grasas y carbohidratos, en muestras de chocolates en concentraciones de 30 a 100 %, y de tres variedades de cacao de Tabasco, México.....	39
Figura 4.1. Espectros VIS-NIR-SWIR del total de las muestras de chocolate (120), preparadas con cada una de las 3 variedades de cacao de Tabasco, México.	53
Figura 4.2. Correlación entre el valor de referencia y el valor estimado por el modelo de predicción PLS, de los parámetros medidos (carbohidratos, valor energético y proximal) en chocolates.	56
Figura 4.3. Correlación entre el valor de referencia y el valor estimado por el modelo de predicción, en la validación externa de los parámetros medidos (carbohidratos, valor energético y proximal) en chocolates.....	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2.1. Composición típica de los macronutrientes del chocolate (adaptada de Lambert, 2009).	5
Cuadro 2.2. Formulación típica de los tres tipos de chocolate (adaptado de Lambert., 2009).	6
Cuadro 2.3. Especificaciones de contenido para la elaboración de chocolate (adaptado de las Normas Mexicanas).....	7
Cuadro 3.1. Comparación de la composición de los chocolates de Tabasco, México preparados con cada una de las tres variedades, al 70 % cacao.	34
Cuadro 3.2. Comparación de los chocolates de cada una de las tres variedades de cacao de Tabasco con el chocolate comercial Gran Saman de Venezuela. 70 % de cacao en todos los chocolates.....	34
Cuadro 3.3. Comparación entre los chocolates de tres variedades de cacao de Tabasco con el chocolate comercial Apamate (73.5 % cacao) de Venezuela.....	35
Cuadro 4.1. Calificadores estadísticos para selección y validación interna de los modelos de calibración PLS.	51
Cuadro 4.2. Calificadores estadísticos para la validación externa selección de los modelos de calibración PLS.	52
Cuadro 4.3. Tratamientos matemáticos y estadísticos para la construcción y selección de los modelos PLS, para propiedades de chocolate elaborado con tres variedades de cacao.....	54
Cuadro 4.4. Parámetros estadísticos de validación interna del grupo de entrenamiento para la construcción de modelos de predicción de la composición de los chocolates de Tabasco, México.	55
Cuadro 4.5. Parámetros estadísticos de la validación externa de los modelos de predicción de la composición de los chocolates de Tabasco, México.....	59

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Evaluar la calidad de los productos alimenticios para conocer su contenido nutrimental, es obligatorio para los fabricantes. Para ello, existen metodologías de la química analítica para cuantificar sus características físico-químicas. Tal es el caso del chocolate, del cual su composición está en función de diferentes sustancias; en gran medida depende de la variedad y concentración del cacao con el que está elaborado. Conocer estas sustancias permite categorizar y asignar un valor de mercado por concepto de producto único o de calidad (Talbot, 2015; Thangaraj, 2016).

Las propiedades físicas y químicas pueden determinarse por métodos convencionales que se encuentran pre-establecidos en las Normas Mexicanas, para chocolate amargo (NMX-F-059-1964) y de mesa (NMX-F-061-1964). Estos métodos son lentos, tediosos y requieren uso de reactivos químicos que generan residuos contaminantes; y solo se obtiene información de los compuestos individuales o específicos de la muestra. En años recientes la industria de los alimentos ha mostrado interés en utilizar la tecnología de infrarrojo cercano (NIR), la cual se plantea como una solución para disminuir la manipulación de las muestras, reducir el tiempo de los procedimientos analíticos; además del costo y uso de reactivos (Ozaki *et al.*, 2006; Burns & Ciurczak, 2008; Deng *et al.*, 2018; Grassi, 2018; Quelal-Vásconez *et al.*, 2018).

Para cumplir el objetivo de esta investigación se obtuvieron 120 muestras de chocolate con concentraciones de 30 a 100 % cacao, en intervalos de 10 %, con 5 repeticiones en cada concentración de cacao, y para cada una de las tres variedades (forastero, trinitario y criollo). Las muestras fueron ralladas, molidas, tamizadas y conservadas a (20 °C), para los análisis respectivos. Los análisis físico-químicos que se realizaron fueron: porcentaje de humedad, ceniza, proteína, grasa, carbohidratos (calculados por diferencia) $100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa})$ (FAO, 2003; BeMiller, 2017) y el valor energético en kilocalorías ($\text{kcal} = [(4 \times \text{proteínas}) + (4 \times \text{carbohidratos}) + (9 \times \text{grasa total})]$) (FAO, 2003). La información espectral de las muestras fue obtenida en modo reflectancia en el intervalo de longitud de 400- 2498 nm a intervalos de 2 nm, directamente en la barra de chocolate colocada en la celda porta muestra con una temperatura de ~20 °C. Dicha medición se realizó con antelación a la manipulación y preparación de las muestras para el análisis de laboratorio.

Una vez obtenidos los datos químicos y espectrales, el objetivo de esta investigación fue implementar la tecnología NIR para generar y evaluar el mejor modelo de calibración que estimara los carbohidratos y un grupo de atributos de calidad.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, existen en el mercado productos llamados “chocolates” y son conocidos como chocolates blancos. Estos contienen manteca o licor de cacao (y no pasta de cacao), leche en polvo y azúcar. Muchos fabricantes reemplazan la manteca de cacao por manteca vegetal, añaden caramelo e incluso utilizan cascarilla de cacao para reducir la cantidad de pasta pura (Salas y Hernández, 2015).

Detectar este tipo de anomalías en la constitución del chocolate requiere de tiempo y de diversas metodologías analíticas. Determinar, de manera rápida y precisa, la cantidad de carbohidratos y otros compuestos presentes en el chocolate, es de importancia para la industria. Ya que, debido a las regulaciones de etiquetado de los productos alimenticios; esta debe mostrar las especificaciones de contenido neto y valores nutricionales de referencia (Moros *et al.*, 2007; Hue *et al.*, 2014).

El chocolate al ser una matriz de composición heterogénea, precisa de varios análisis de la química convencional para conocer su constitución. Los métodos conocidos y aceptados para determinar carbohidratos, contenido proximal y poder calórico como Kjeldahl, Soxhlet, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, cromatografía líquida de alta resolución, colorimetría y espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente; aunque son precisos, también son lentos, tediosos y requieren uso de reactivos químicos, que generan residuos del laboratorio. Además, son métodos con alta manipulación de la muestra lo que incrementa el error analítico; y al ser métodos destructivos, no hay posibilidad de repetir el análisis. Por ello, es requerido un método rápido, preciso y no destructivo (Teye *et al.*, 2013).

La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS) es una técnica multianalítica no destructiva y no invasiva, muy eficiente para el análisis de productos agronómicos y agroalimentarios como el chocolate. Con el NIRS es posible medir las características físicas y químicas, basado en la propiedad vibracional de los enlaces químicos de las moléculas orgánicas y sus interacciones con radiación infrarroja; y sin alterar la composición de la muestra. Por lo tanto esta técnica se plantea como una alternativa eficiente de análisis de las características físico-químicas del chocolate, con la ventaja de ser más rápida y con menor error analítico (Veselá *et al.*, 2007; Hue *et al.*, 2014).

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Validar un modelo de calibración para la determinación de carbohidratos, valor energético y análisis proximal en chocolate golosina mediante espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS)

1.2.2. Objetivos Específicos

- ❖ Realizar el análisis de carbohidratos, valor energético y proximal en chocolate golosina para obtener los valores de referencia.
- ❖ Generar la librería espectral con la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS).
- ❖ Evaluar modelos de calibración mediante validación interna y externa para seleccionar el que mejores indicadores estadístico cumpla.

1.3. HIPÓTESIS

La tecnología NIR genera información útil y suficiente para establecer modelos de calibración para la cuantificación de carbohidratos, valor energético y contenido proximal en chocolate golosina.

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CHOCOLATE

Los granos de cacao son el ingrediente principal para la producción de chocolate. El proceso de producción de chocolate consiste en fermentación, secado, tostado (donde se producen las principales reacciones químicas para el desarrollo de aroma y sabor) y molido de granos de cacao. Además de la mezcla de los ingredientes: sólidos de cacao, azúcar, manteca de cacao, emulsionantes, saborizantes y componentes de la leche, si es necesario; finalmente el conchado para dar textura y consistencia final al chocolate (Barišić, 2019).

El chocolate es un producto de gran consumo con niveles altos de macronutrientes como grasas, proteínas, carbohidratos (Cuadro 2.1), polifenoles y otros compuestos bioactivos. La manteca de cacao es la principal o única fuente de grasa en el chocolate donde se encuentran dispersos los sólidos no grasos (Figura 2.1), a no ser que se añada otro tipo de grasa (vegetal o de leche). Está compuesta por ácido esteárico, ácido oleico y ácido palmítico en una proporción de 34, 34 y 27 % respectivamente. La sacarosa añadida proporciona la mayor parte de los carbohidratos. La cantidad y el tipo de carbohidrato presente son importantes debido a su efecto en el índice glucémico. El cacao no es una fuente importante de proteínas y la digestibilidad es baja. Sin embargo, la leche en el chocolate es una buena fuente de proteínas de alto valor biológico (Lambert., 2009; Talbot, 2015).

Cuadro 2.1. Composición típica de los macronutrientes del chocolate (adaptada de Lambert, 2009).

Tipo de chocolate	Proteína (g)*	Grasa (g)*	Carbohidratos (g)*	Energía (kcal)
Puro	5.0	28.0	63.5	510
Con leche	7.7	30.7	56.9	520
Blanco	8.0	30.9	58.3	529
Fino y relleno	4.9	21.3	62.9	447

* Por 100 g

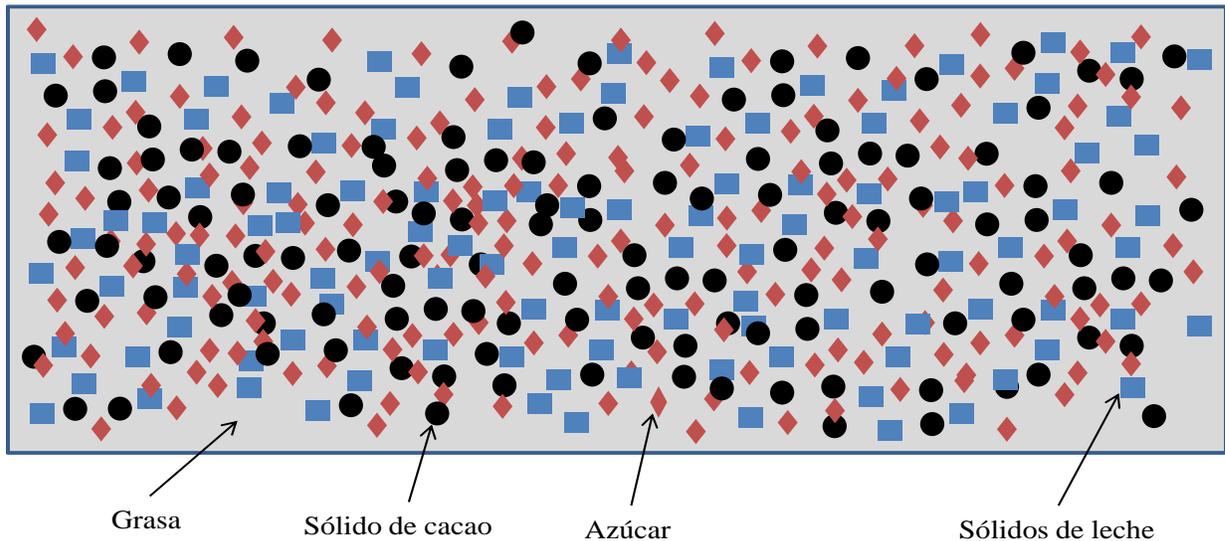


Figura 2.1. Representación esquemática de la estructura del chocolate (adaptada de Talbot, 2015).

Es muy importante conocer en qué proporciones se encuentran los ingredientes, indicados en el Cuadro 2.1, para categorizar el chocolate. El cual se puede dividir en tres tipos: 1) chocolate puro (u oscuro), 2) chocolate con leche y 3) chocolate blanco. En términos generales, el chocolate puro no contiene grasas lácteas, ni sólidos lácteos sin grasa; mientras que el chocolate blanco no contiene cacao sin grasa. Realizar distintas combinaciones de estos ingredientes produce diferentes tipos de chocolate (Cuadro 2.2). Otro factor variable en la composición del chocolate es el contenido total de grasa. Esta puede variar del 25 % (a menudo el mínimo definido en la legislación sobre el chocolate) al 29-30 % como un nivel más normal hasta el 33-35% en algunos chocolates premium. En los chocolates oscuros premium con alto contenido de cacao, el contenido de grasa es alto (Talbot, 2015).

Cuadro 2.2. Formulación típica de los tres tipos de chocolate (adaptado de Lambert., 2009).

Tipo de chocolate	Sólidos de cacao*	Manteca de cacao*	Leche entera en polvo*	Azúcar*	Lecitina*	Grasa Total*
Puro	32.5	15.5		51.6	0.4	33.4
Con leche**	20.0	18.25	15.0	46.35	0.4	33.0
Blanco		27.0	23.0	49.6	0.4	32.8

* Porcentaje

** Bajo en grasa

Debido a que cada compañía posee la patente de sus formulaciones, no es posible establecer una receta general para la elaboración de los chocolates. Por esa razón las legislaciones nacionales especifican los contenidos máximos y mínimos permisibles que constituyen los chocolates. A nivel internacional se tiene, como guía, la norma del Codex para chocolate, la cual se encuentra en STAN 87-1981. Los Estados Unidos de Norteamérica y la Unión Europea tienen un estándar en la composición de chocolate; y son, el Código de Regulaciones Federales y la norma 2000/36/CE, respectivamente. México tiene las Normas Mexicanas (NMX) (SCFI 1964; SCFI 1982), las cuales establecen los siguientes estándares de elaboración del chocolate y se resumen a continuación (Cuadro 2.3) (Talbot., 2015).

Cuadro 2.3. Especificaciones de contenido para la elaboración de chocolate (adaptado de las Normas Mexicanas).

Especificaciones	Chocolate amargo		Chocolate con leche*		Chocolate para mesa**	
	Mínimo %	Máximo %	Mínimo %	Máximo %	Mínimo %	Máximo %
Humedad		2.0		2.0		2.0
Manteca de cacao	22.0				25.0	
Fibra cruda		2.2		0.42		2.2
Grasa total			23.0			
Grasa butírica			3.0			
Cenizas totales		1.9		1.24	1.9	2.1
Proteína			4.68		7.25	
Sacarosa		70.0		57.63		40.0
Teobromina	0.36				0.45	

* Leche entera

** Tipo amargo

Tabasco y Chiapas son los estados donde se cultiva la mayor parte de la producción nacional de cacao, con 18,327 y 9,810 toneladas, respectivamente (SIACON, 2018). Sin embargo, Salas y Hernández (2015) indican que las naciones desarrolladas son quienes transforman el cacao en una variedad de productos finales para ser comercializados y con ello le dan valor agregado. También

señalan que debido a las prácticas fraudulentas en su elaboración y etiquetado de los chocolates, y su baja calidad nutricional, es un riesgo para la salud del consumidor.

Por esta razón, se incrementan los consumidores de chocolate mejor informados, más conscientes y exigentes en el cuidado de su salud; que demandan productos sin aditivos/conservadores, orgánicos y más naturales. Por ello, la industria produce chocolates en presentaciones de 87 g con objeto de reducir las porciones habituales y tener un consumo moderado, menor a 100 g; con un aporte nutricional significativo; que incluyen antioxidantes añadidos, alto contenido de fibra, vitaminas y minerales como hierro, fósforo, zinc, calcio y magnesio (Naprta, 2015). Otras tendencias son: productos “100 % cacao” y “chocolate crudo”. Debido a estudios recientes que relacionan el consumo de chocolate oscuro con beneficios cardiovasculares como la regulación de la presión arterial y la función endotelial. (Higginbotham & Taub., 2015; Naprta, 2015).

Por tal motivo, el análisis proximal de los alimentos se asume imprescindible para conocer el valor nutricional de los chocolates.

2.2. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

Las investigaciones en ciencia y tecnología de alimentos, ya sea por la industria alimentaria, agencias gubernamentales o universidades, con frecuencia requieren la determinación de la composición y características de los alimentos. La naturaleza de la muestra, la razón específica del análisis, la velocidad y la precisión, definen la elección de métodos analíticos (Nielsen, 2017).

2.2.1. Análisis proximal

El sistema proximal para el análisis de alimentos, se creó para obtener una clasificación amplia y con un nivel máximo de sus componentes. Consiste en la determinación analítica de los principales componentes estructurales de los alimentos; entre ellos, el contenido de humedad (o sólidos totales), determinación de cenizas, los lípidos (o grasas), el nitrógeno proteico y carbohidratos totales. Los cuales deben ser evaluados durante, y después, de la producción. Existen metodologías bien fundamentadas para la cuantificación de estos parámetros, con finalidades legislativas, aseguramiento de la calidad y conocimiento del valor nutricional de los alimentos (Greenfield & Southgate, 2006).

2.2.2. Determinación de humedad

Se denomina contenido de humedad o agua en los alimentos. Su determinación es uno de los procedimientos analíticos importantes que se realizan en un producto alimenticio. La materia seca que queda después de la eliminación de la humedad se conoce comúnmente como sólidos totales. Este valor analítico es de importancia económica para un fabricante de alimentos, ya que la variabilidad en su contenido afecta la composición y la calidad del producto. Existen límites legales sobre la cantidad de agua que puede o no puede estar presente en algunos alimentos, dependiendo si son líquidos, sólidos o semisólidos (Greenfield & Southgate, 2006; Mauer & Bradley, 2017).

Los métodos para determinar humedad se clasifican en métodos directos y métodos indirectos. Los métodos directos se realizan mediante la eliminación de agua; aunque el método para la eliminación de la humedad puede variar. El secado, la destilación y la extracción se usan comúnmente para eliminar la humedad, seguido de pesaje, volumetría o valoración para determinar el contenido de humedad. Los métodos indirectos se basan en las propiedades de los alimentos que están relacionadas con la presencia de agua, como la capacidad, la gravedad específica, la densidad, el índice de refracción, el punto de congelación y la absorción electromagnética (Greenfield & Southgate, 2006; Mauer & Bradley, 2017).

En algunos métodos oficiales se recomiendan temperaturas menores a 70 °C, con la finalidad de no modificar otras estructuras de interés analítico. Dos ejemplos de estos métodos son, el secado al vacío y la liofilización; este último es más caro, pero con la ventaja de un secado que no modifica la composición. El método de Karl Fischer es especialmente útil para alimentos con un contenido de humedad muy bajo y para los productos alimenticios higroscópicos difíciles de secar con métodos convencionales (Greenfield & Southgate., 2006; Mauer & Bradley., 2017).

2.2.3. Determinación de cenizas

La ceniza es un primer paso en el análisis mineral proximal o específico. El contenido de cenizas de los alimentos puede variar del 0 al 12 %, pero rara vez supera el 5 % para los alimentos frescos. La ceniza se refiere al residuo inorgánico (mineral) que queda después de la combustión u oxidación completa de la materia orgánica facilitada por el ácido en los alimentos. Se utilizan dos tipos principales de cenizas: cenizas secas y cenizas húmedas (Harris & Marshall, 2017).

La ceniza seca se utiliza en la composición pr3ximal y para el an3lisis mineral espec3fico. La incineraci3n en seco requiere temperaturas altas (500–600 °C), que se pueden lograr mediante calentamiento convencional o por microondas. La ceniza h3meda (oxidaci3n facilitada por el 3cido) se utiliza como preparaci3n para el an3lisis de minerales que pueden volatilizarse y perderse durante la ceniza seca. La ceniza h3meda usa temperaturas m3s bajas que la ceniza seca y se basa en 3cidos fuertes y qu3micos oxidantes para eliminar muestras de material org3nico (Harris & Marshall, 2017).

2.2.4. Determinaci3n de grasa

Los l3pidos son sustancias, en general, son solubles en 3ter, cloroformo u otros solventes org3nicos, pero poco solubles en agua. El m3todo cl3sico para la medici3n de "grasas totales" se basa en una extracci3n continu3a realizada en muestras secas de alimentos con un extractor Soxhlet, en ocasiones precedida de una hidr3lisis 3cida (Greenfield & Southgate, 2006; Ellefson, 2017).

Sin embargo, los alimentos contienen diferentes tipos de l3pidos; pero los de mayor importancia son los triacilgliceroles (o triacilglic3ridos) y los fosfol3pidos; para los cuales se han desarrollado m3todos cromatogr3ficos para su detecci3n. Los triacilgliceroles l3quidos a temperatura ambiente se denominan aceites, como el aceite de soja y el aceite de oliva, y generalmente son de origen vegetal. Los triacilgliceroles, s3lidos a temperatura ambiente, se denominan grasas. La manteca de cerdo y sebo son ejemplos de grasas, que generalmente son de origen animales. El t3rmino grasa es aplicable a todos triacilgliceroles, ya sean normalmente s3lidos o l3quidos a temperatura ambiente (Greenfield & Southgate, 2006; Ellefson, 2017).

La tecnolog3a NIR muestra bandas de absorci3n de grupos carbonilo en la regi3n infrarroja, por este motivo se ha utilizado en el an3lisis de l3pidos. Con aplicaciones en an3lisis ordinarios de muestras como cereales y productos l3cteos. Un an3lisis cuantitativo y cualitativo exacto de los l3pidos en los alimentos es importante para el etiquetado nutricional, para determinar que el alimento cumple con el est3ndar de identidad y para garantizar que cumple con las especificaciones de fabricaci3n. Las inexactitudes en el an3lisis resultan costosas para los fabricantes y con resultados indeseables de calidad y funcionalidad, del producto (Greenfield & Southgate, 2006; Ellefson, 2017).

2.2.5. Determinación de proteínas

Las proteínas son compuestos complejos presentes en las células con funciones fisiológicas y estructurales. Están compuestas de los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno, oxígeno y azufre. El nitrógeno es el elemento más importante de las proteínas; pero el contenido cambia en las proteínas de los alimentos de 13.4 a 19.1 %, debido a la variación en la composición de aminoácidos específicos (Chang & Zhang, 2017).

En el sistema proximal, se multiplica el nitrógeno total (N) por un factor específico (6.25) para estimar las proteínas (por la hipótesis de que las proteínas contienen 16 % de nitrógeno), es predominante. Se han desarrollado métodos para medir el contenido de proteínas, los principales son la determinación de nitrógeno total (por Kjeldahl o Dumas), enlaces peptídicos, aminoácidos aromáticos, capacidad de unión de colorantes, absorción ultravioleta de proteínas y propiedades de dispersión de la luz (por NIR) (Greenfield & Southgate, 2006; Chang & Zhang, 2017).

Sin embargo, dependiendo de la metodología utilizada para su determinación, otros componentes alimentarios principales, incluidos los lípidos y los carbohidratos, interfieren físicamente en el análisis de proteínas. Por ello, además de los factores como la sensibilidad, la precisión, velocidad y costo del análisis; debe definirse que se desea medir para la selección apropiado del método para una aplicación particular (Greenfield & Southgate, 2006; Chang & Zhang, 2017).

2.2.6. Determinación de carbohidratos

En términos nutricionales, los carbohidratos se dividen en tres grupos con base en el grado de polimerización: 1) azúcares (monosacáridos y disacáridos), 2) oligosacáridos (polímeros que contienen de tres a nueve unidades de monosacáridos) y 3) polisacáridos (polímeros con más de nueve unidades). Están presentes en los alimentos como una fuente de energía, para impartir propiedades texturales cruciales y como fibra dietética; que en general, contribuyen en la salud. Además, proporcionan a los alimentos, otros atributos como volumen, cuerpo, viscosidad, estabilidad a las emulsiones y espumas, capacidad de retención de agua, estabilidad al congelamiento y descongelamiento y pardeamiento. Incluyendo la generación de sabor y aroma, textura y puede disminuir la actividad del agua e inhibir así el crecimiento microbiano (Greenfield & Southgate, 2006; BeMiller, 2017).

El análisis de carbohidratos es importante por sus propiedades metabólicas y fisiológicas. Con fines nutricionales, no es adecuado considerarlos como un componente único de los alimentos. Los análisis cualitativos y cuantitativos de carbohidratos se utilizan para determinar su fracción analítica en alimentos y bebidas. El análisis cualitativo asegura que las etiquetas de ingredientes presentan información de composición precisa y el análisis cuantitativo garantiza que los componentes agregados se enumeren en el orden correcto (Greenfield & Southgate, 2006; BeMiller, 2017).

De acuerdo con la regulación de etiquetado vigente, los carbohidratos que deben mostrarse a detalle: carbohidratos totales, fibra dietética, azúcares totales, azúcares añadidos y azúcar de alcoholes. Para ello existe distintas metodologías como: 1) carbohidratos totales por diferencia, 2) carbohidratos totales por el método ácido fenol-sulfuro, 3) azúcares reductores totales por el método de Somogyi-Nelson, 4) azúcares reductores por el método Lane-Eynon, 5) polarimetría, 6) reductimetría, 7) colorimetría, 8) métodos enzimáticos específicos, 9) GLC y 10) HPLC (Greenfield & Southgate, 2006; BeMiller, 2017).

2.3. TECNOLOGÍA DE INFRARROJO CERCANO (NIR)

La espectrometría de infrarrojo cercano (NIR) es un método instrumental para adquirir espectros por la irradiación de una muestra con una fuente luminiscente (Figura 2.2). Los espectros se utilizan para determinar características tanto cualitativas como cuantitativas. La espectrometría NIR es popular debido: 1) velocidad de análisis, 2) poca o ninguna preparación de muestra, 3) análisis múltiples desde un solo escaneo y 4) un proceso de medición no destructivo. El método de análisis NIRS se basa en que cada uno de los componentes químicos de una muestra tiene propiedades de absorción en el infrarrojo cercano que se pueden utilizar para diferenciar un componente de los otros (Marten *et al.*, 1989; McClure & Tsuchikawa, 2006).

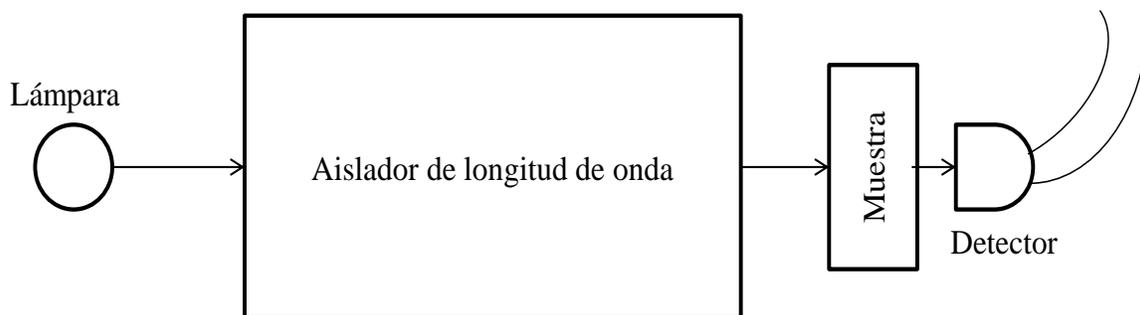


Figura 2.2. Espectrómetro NIR generalizado con tres partes básicas: lámpara, aislador de longitud de onda y detector (adaptado de McClure & Tsuchikawa, 2006).

La suma de estas propiedades de absorción, combinadas con las propiedades de dispersión de radiación de la muestra, determina la reflectancia difusa de una muestra. Por lo tanto, la señal de reflectancia difusa del infrarrojo cercano contiene información de la composición de la muestra. La información de composición se puede extraer mediante el tratamiento matemático y estadístico de los datos de reflectancia. La espectroscopia NIR es cada vez más importante en la ciencia y tecnología de los alimentos como técnica analítica no destructiva. El incremento anual de publicaciones de investigación que tratan sobre las aplicaciones de la espectroscopia NIR en la industria alimentaria, es notable (Marten *et al.*, 1989; Ozaki *et al.*, 2006).

La región del infrarrojo cercano se define generalmente en la región que comprende las longitudes de onda de 700 a 3000 nm; sin embargo, la mayoría de los análisis cuantitativos por reflectancia se realizan en la región de 1200 a 2500 nm, porque los sobretonos y las bandas combinadas son muy fuertes y proporcionan un buen rendimiento analítico, produciendo espectros con solo 650 puntos de datos separados cada 2 nm. Es sensible a las absorciones que origina a partir de los armónicos de las vibraciones de estiramiento de CH, NH, OH y SH; así como a partir de combinaciones de estiramiento-flexión que involucran a estos grupos relacionados con los componentes de los alimentos (Marten *et al.*, 1989; Sandorfy *et al.*, 2006).

Los sobretonos y los tonos combinados se ven afectados con mayor frecuencia por la formación de enlaces de hidrógeno, algunos aspectos de los cuales se pueden supervisar para obtener ventajas en el infrarrojo cercano. Además, pueden aparecer algunas transiciones electrónicas en el rango superior del infrarrojo cercano, cerca del visible, especialmente en el rango de 650 a 1100 nm (Marten *et al.*, 1989; Ozaki *et al.*, 2006).

El procedimiento más simple para el análisis de un componente, es medir la reflectancia en dos longitudes de onda; una longitud de onda elegida para estar en un punto de absorción máximo y la otra elegida para estar en un punto de absorción mínimo. La relación de estos dos valores de reflectancia medidos en diferentes muestras puede correlacionarse con la concentración de ese constituyente específico. Al realizar esta correlación, se puede desarrollar una ecuación para predecir la concentración del constituyente en las muestras. Tales ecuaciones se pueden desarrollar para cada uno de los constituyentes en las muestras mediante el uso de datos de reflectancia en longitudes de onda seleccionadas. Existen diferentes métodos estadísticos y matemáticos para tratar los datos de reflectancia y así obtener la mejor predicción de la composición de la muestra (Marten *et al.*, 1989).

El análisis de datos multivariados es útil para el análisis espectral en la región NIR. Por que permite superar el problema de la multicolinealidad. Los métodos de análisis de datos multivariados más utilizados son: 1) la regresión por componentes principales (PCR), 2) la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR), 3) la resolución de curva de modelado automático (SMCR), que se utiliza para predecir espectros de componentes puros y perfiles de concentración de componentes puros a partir de un conjunto de espectros NIR (Ozaki *et al.*, 2006).

El problema para la implementación de la tecnología NIRS es el uso de los procedimientos analíticos tradicionales para medir la calidad de los productos y han sido utilizados por la industria agrícola, para generar los valores de referencia. La dificultad para relacionar la teoría química y espectroscópica a nivel molecular, se resolvió con la demostración de que los resultados con NIRS replican los obtenidos con los métodos convencionales (Shenk *et al.*, 2008).

A la fecha, existen buenos ejemplos en la literatura (Melenteva *et al.*, 2016; Vann *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017) del papel de la espectroscopia NIR para la trazabilidad, autenticación, etiquetado de productos y supervisión *online* de agroalimentos. También se hace mención de los avances recientes de la espectroscopía NIR aplicada a la tecnología analítica de procesos, donde informa de las aplicaciones más destacadas a escala laboratorio e industrial (Grassi, 2018).

El hecho de que la tecnología NIR posea un tiempo de respuesta rápido, simplicidad en la preparación de la muestra (reducción del error analítico), mediciones no destructivas y bajo costo de instrumentación; han favorecido su expansión en la producción y el procesamiento de alimentos.

Con aplicación directa en el diseño, análisis y control de la fabricación por mediciones en tiempo real (durante el proceso) de los atributos críticos de calidad y de esta manera garantizar la misma (Ozaki *et al.*, 2006; Burns & Ciurczak, 2008; Grassi, 2018).

2.4. QUIMIOMETRÍA

El término quimiometría se definió en 1971 para describir el uso creciente de modelos matemáticos, principios estadísticos y otros métodos basados en la lógica en el campo de la química, específicamente en el campo de la química analítica. La quimiometría se convirtió en un campo interdisciplinario que además de los modelos matemáticos, involucra conjuntamente estadísticas multivariadas y ciencias de la computación. Debido a este conjunto de características, los primeros métodos quimiométricos se enfocaron en la clasificación y al análisis discriminante. Sin embargo, la demanda de modelos cuantitativos condujo a la inclusión de métodos de regresión, lo que permite el desarrollo de modelos de predicción cuantitativa (Yang & Trewn, 2004; Gemperline, 2006).

Las principales áreas de aplicación de la quimiometría incluyen calibración, validación y pruebas de significancia; optimización de mediciones químicas y procedimientos experimentales; y la extracción de la máxima información química de los datos analíticos. Esta diversidad en el análisis permite a los profesionales dar sentido a las mediciones, modelar cuantitativamente, producir representaciones visuales de datos y recopilar información relevante a través de diseños experimentales (Yang y Trewn, 2004; Gemperline, 2006).

La quimiometría es en una herramienta de análisis de datos establecida en áreas como la calibración multivariada, el modelado cuantitativo de la estructura de la actividad, el reconocimiento de patrones y el monitoreo y control estadístico multivariado de procesos. Con objeto de mejorar y controlar el proceso químico y el diseño de productos químicos (Yang & Trewn, 2004).

2.5. EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DE DATOS

Los espectros se producen cuando la intensidad de la fuente de luz, en las diferentes longitudes de onda, se altera después de la interacción con los objetos (muestras). Dicha variación en la intensidad de la luz se debe a la absorción de la energía de la luz por las moléculas en la materia (propiedades químicas) y al efecto de dispersión provocado por la característica de falta de homogeneidad (propiedad física) de los objetos medidos. Por lo tanto, los espectros de las muestras registran información química y física importante sobre los objetos detectados y esto forma la base para futuros análisis de modelado (Feng & Zhao, 2019).

2.5.1. Tratamiento de datos espectrales

Cuando los espectros se obtienen de un conjunto de muestras que contienen componentes diversos, es necesario pretratar los datos antes del análisis multivariado. La selección de este pretratamiento debe basarse en el conocimiento del instrumento, la naturaleza de las muestras y el tipo de modelo destinado a la aplicación particular (Christy & Kvalheim, 2006).

Por lo general, se realizan pretratamientos a los datos experimentales para reducir el ruido, corregir las variaciones de la línea de base, mejorar la resolución espectral aparente y/o normalizar los datos. Los métodos de pretratamiento se pueden dividir en cuatro categorías. (1) Reducción de ruido: El suavizado (o *Smoothing*) es un método representativo para la reducción de ruido. (2) Corrección basal: La segunda derivada y la corrección de dispersión multiplicativa (MSC, siglas en inglés) se emplean con mayor frecuencia para la corrección de la línea de base. (3) El centrado y la normalización que se utiliza para ajustar la dispersión de los datos, y (4) La mejora de la resolución. Los espectros de diferencia, el centrado medio y la segunda derivada se utilizan en la espectroscopía NIR como métodos de mejora de la resolución (Ozaki *et al.*, 2006).

Otro método independiente de referencia que se utiliza con frecuencia para suprimir el efecto de dispersión en los espectros es, *Variable Normal Estándar*. Este tiene un efecto muy similar al MSC, el cual se desarrolló primero para eliminar la interferencia de dispersión de las muestras (Feng & Zhao, 2019).

El centrado medio y el escalado de la varianza son los métodos más utilizados para preprocesar datos multivariados. En conjunto, producen el autoescalado. La normalización es un ajuste a un conjunto de datos que iguala la magnitud de cada muestra (Ozaki *et al.*, 2006; Boysworth & Booksh, 2008).

2.6. CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE

Los métodos de predicción cuantitativa, son aquellos en los que se toman en cuenta variables predictoras para tener una única respuesta (regresión múltiple) con una ecuación (Ecuación 2.1); y para predecir varias respuestas interdependientes (regresión multivariante) con k ecuaciones respuestas (Ecuación 2.2). En la predicción múltiple y multivariante se utilizan modelos en los que la variable independiente, x , es siempre la predictora (una señal instrumental o una combinación lineal de varias señales instrumentales), tanto en la etapa de calibración como en la de predicción, la variable dependiente \hat{y} , es siempre la respuesta (la concentración de un analito de interés) (Ramis y García., 2001)

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_jx_j + \dots + b_mx_m \quad (2.1)$$

$$\hat{y} = b_{01} + b_{11}x_1 + b_{21}x_2 + \dots + b_{j1}x_j + \dots + b_{m1}x_m \quad (2.2)$$

.....

$$\hat{y} = b_0 + b_{1k}x_1 + b_{2k}x_2 + \dots + b_{jk}x_j + \dots + b_{mk}x_m$$

Dónde:

\hat{y} = es la variable respuesta o dependiente

x = es la variable predictora o independiente

b = es la pendiente o coeficiente de regresión

La calibración multivariada o multivariante a través de un microordenador, utiliza un conjunto de muestras de calibración con composición conocida (excluyendo el 10 % de estas), para "entrenar" al modelo matemático cómo eliminar errores sistemáticos debido a interferencias en los datos medidos. Luego, los resultados matemáticos se utilizan para obtener una determinación rápida de la composición química de muestras similares desconocidas (o del 10 % excluido), independientemente del nivel de estas interferencias. Es decir, que el modelo de regresión multivariante consiste en construir una relación entre un atributo físicas, químico o biológico deseado de un objeto y sus espectros (Kowalski, 1984; Bjørsvik & Martens, 2008; Kamruzzaman, 2019).

En la actualidad, el mejor ejemplo de calibración multivariante es la espectroscopia de alimentos con luz difusa. La determinación rápida de la composición química en los alimentos mediante la medición de la reflectancia de longitud de onda múltiple del infrarrojo cercano (NIR), tiene una alta aceptación. Para generar la calibración con el instrumento NIR, en un conjunto de muestras primero se mide la propiedad química de interés con un método de referencia (convencional), posteriormente se obtienen los espectros de reflectancia NIR de cada muestra; ambos servirán para el grupo de calibración (Kowalski, 1984).

Una vez obtenidos ambos datos, con ayuda de un programa de computadora para modelado estadístico multivariante, se selecciona un método de regresión. Los métodos de regresión multivariante más utilizados en el análisis cuantitativo son la regresión lineal múltiple (MLR, siglas en inglés), la regresión por componentes principales (PCR, siglas en inglés) y la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLSR, siglas en inglés). Esta última, es la más implementada debido a su capacidad de descomponer una gran cantidad de variables independientes, en un pequeño un pequeño número de factores ortogonales llamadas "variables latentes" (VL) (Kamruzzaman, 2019).

Estas "VL" están diseñadas para contener la mayor información de la variable x y la variable \hat{y} . Además, las "VL" son estadísticamente independientes (no correlacionadas) y poseen toda la información relevante que conduce a predicciones más estables. Posteriormente las "VL" se utilizan para determinar los coeficientes que relacionan las mediciones de NIR con el contenido de la propiedad estudiada (es decir, valores de referencia medidos en las muestras del conjunto de calibración).

Una vez generado y evaluado el modelo, el contenido de la propiedad en muestras nuevas y desconocidas se puede determinar midiendo su espectro NIR y multiplicándolo con el espectro del coeficiente de calibración estimado. Esto significa que se pueden predecir los valores de x a partir de los valores \hat{y} (Kowalski, 1984; Kamruzzaman, 2019).

2.7. REGRESIÓN-PLS

La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) es un método estadístico, una técnica de calibración multivariada que guarda relación con la regresión de componentes principales. PLS encuentra un modelo de regresión lineal proyectando las variables predichas (\hat{y}) y las variables observables (x) en un nuevo espacio. Debido a que los datos x e \hat{y} se proyectan a nuevos espacios, la familia de métodos PLS se conoce como modelos de factor bilineal. PLS se utiliza para encontrar la relación fundamental entre dos matrices (x e \hat{y}), que es un enfoque de variable latente para modelar las estructuras covariantes en estos dos espacios. La aplicación de PLS aumenta en la química, como lo es el control analítico, físico, químico clínico y de procesos industriales. (Geladi & Kowalski, 1986; Miller & Miller, 2002; Nollet, 2019).

Cada paso del algoritmo de gradiente conjugado da la estimación PLS en el rango correspondiente, así como la importancia predictiva de cada estimación secuencial se puede probar mediante validación cruzada. Al mismo tiempo, se obtienen estimaciones de Jackknife de los errores estándar del coeficiente de regresión. De esta manera una regla de detención eficiente es generada; de la cual se utiliza el rango que le da al modelo las mejores propiedades predictivas en el sentido de validación cruzada. El método es particularmente atractivo porque solo se necesitan dos multiplicaciones de matriz de vectores para cada estimación de rango sucesiva; y los cálculos se realizan sobre los datos sin procesar de la variable \hat{y} y la variable x , y la matriz de momento no necesita ser calculada. Esto hace que el método sea adecuado para grandes problemas donde la cantidad de cómputo con métodos estándar de inversión de matriz o diagonalización se vuelve prohibitiva, es decir que las variables de entrada superan a las variables respuesta (Wold *et al.*, 1984).

2.8. VALIDACIÓN DEL MODELO

La validación es importante en todos los métodos de calibración multivariados. Una vez que se han desarrollado los modelos de calibración, es necesario verificar su confiabilidad para predecir muestras desconocidas, para garantizar que el modelo derivado sea representativo y funcione en el futuro para obtener datos nuevos y similares. En el análisis multivariante, los dos métodos de validación más utilizados son la validación cruzada (validación cruzada segmentaria o validación cruzada completa, validación cruzada de dejar uno fuera), y la validación de prueba (externa). La elección del método de validación depende de los datos; pero la mejor validación es con un conjunto independiente (validación externa), y preferiblemente deben consistir en muestras de diferentes lotes tomadas en diferentes momentos (Kamruzzaman, 2019).

La validación cruzada de un modelo de calibración permite seleccionar el número óptimo de variables o factores latentes, es decir, el número que proporciona el error de predicción mínimo para el conjunto de calibración y los factores con mayor capacidad predictiva. Cuando el número de variables latentes excede el número óptimo, el error de predicción aumenta nuevamente. Al incluir demasiadas variables latentes, se sobreajustan los resultados del modelo de calibración, y al incluir muy pocas, se deja al modelo sin capacidad predictiva (Christy & Kvalheim, 2006; Bjørsvik & Martens, 2008.).

La calidad de los modelos de regresión de calibración multivariada se evalúa mediante criterios estadísticos, como: 1) el error estándar de calibración (SEC), 2) los errores cuadráticos medios de calibración (RMSEC), 3) el error estándar de predicción (SEP), 4) los errores cuadráticos medios de predicción estimados por validación cruzada (RMSECV), 5) coeficientes de determinación para calibración, validación cruzada o predicción (R^2_c , R^2_{cv} y R^2_p , respectivamente), y 6) coeficiente de correlación para calibración, validación cruzada o predicción (R_c , R_{cv} y R_p , respectivamente). Estos parámetros se calculan utilizando las siguientes ecuaciones (Kamruzzaman, 2019):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2} \quad (2.3)$$

$$RMSEC \text{ o } RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_i - y_i)^2}{N}} \quad (2.4)$$

$$SEC = \sqrt{\frac{1}{N_c - 1} \sum_{i=1}^{N_c} (\hat{y}_i - y_i)^2} \quad (2.5)$$

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{N_p - 1} \sum_{i=1}^{N_p} (\hat{y}_i - y_i - bias)^2} \quad (2.6)$$

$$bias = \frac{1}{N_p} \sum_{i=1}^{N_p} (\hat{y}_i - y_i) \quad (2.7)$$

2.9. LITERATURA CITADA

- Barišić, V., Kopjar M., Jozinović A., Flanjak I., Ačkar D., Miličević B., Šubarić D., Jokić S., & Babić J. 2019. The Chemistry behind Chocolate Production. *Molecules* 24, no. 17: 3163. <https://doi.org/10.3390/molecules24173163>.
- BeMiller J. N. 2017 Carbohydrate Analysis. In: Nielsen S. (eds) *Food Analysis*. Food Science Text Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_19.
- Bjørsvik H-R., & Martens H. 2008. Data Analysis: Calibration of NIR Instruments by PLS Regression. In D. A. Burns & E. W. Ciurczak (Eds). *Near-Infrared Analysis. Practical Spectroscopy* (3th ed., Chap. 9, pp.195- 198). Tylor & Francis Group. ISBN 978-08493-7393-0.
- Boysworth M. H., & Booksh K. S. 2008. Aspects of Multivariate Calibration Applied to Near-Infrared Spectroscopy. In D. A. Burns & E. W. Ciurczak (Eds). *Near-Infrared Analysis. Practical Spectroscopy* (3th ed., Chap. 10, pp.208-210). Tylor & Francis Group. ISBN 978-08493-7393-0.
- Chang S. K. C., Zhang Y. 2017. Protein Analysis. In: Nielsen S. (eds) *Food Analysis*. Food Science Text Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_18.
- Christy A. A., & Kvalheim. O. M. 2006. Latent-Variable Analysis of Multivariate Data in Infrared Spectroscopy. In Y. Ozaki., W. F. McClure., & A. A. Christy (Eds). *Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology*. (Chap. 6, pp. 150-151). Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN-13: 978-0-471-67201-2. DOI: 10.1002 / 9780470047705.
- Ellefson W. C. 2017. Fat Analysis. In: Nielsen S. (eds) *Food Analysis*. Food Science Text Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_17.
- Feng Y-Z., & Zhao H-T. 2019. Data extraction and Treatment. In N. C. Basantia., L. M. L. Nollet & M. Kamruzzaman (Eds). *Hyperspectral Imaging Analysis and Applications for Food Quality*. (1st ed., Chap. 4, pp. 45-50). ISBN: 9781351805940.

- Geladi P., & Kowalski B. R. 1986. Partial Least-Squares Regression: A Tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 186, 1-17.
- Gemperline P. (2006). *Practical guide to chemometrics*. Boca Raton London New York, (2da. Ed), 2-3. SN - 1-57444-783-1. doi - 10.1201/9781420018301.fmatt.
- Grassi, S. (2018). Advances in NIR spectroscopy applied to Process Analytical Technology in food industries, *COFS* <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.12.008>.
- Greenfield H. & Southgate, D. 2006. *Datos de composición de alimentos: obtención, gestión y utilización*. Roma: FAO. ISBN 978-92-5-304949-3.
- Harris G. K., & Marshall M. R. 2017. Ash Analysis. In: Nielsen S. (eds) *Food Analysis*. Food Science Text Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_16.
- Kamruzzaman M. (2019). Multivariate Analysis and Techniques. In N. C. Basantia., L. M. L. Nollet & M. Kamruzzaman (Eds). *Hyperspectral Imaging Analysis and Applications for Food Quality*. (1st ed., Chap. 5, pp. 61-64). Taylor & Francis Group. ISBN: 9781351805940.
- Kowalski B. R. 1984. *Chemometrics Mathematics and Statistics in Chemistry*. Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, Washington, U.S.A. 147-156.
- Lambert J. P. 2009. Nutrition and Health aspect of Chocolate. In S. T. Beckett (Ed.), *Industrial Chocolate manufacture and use* (4th ed., Vol. 1, pp. 623-628). John Wiley & Sons Ltd. ISBN-13: 978-1-4051-3949-6.
- Marten G. C., Shenk J. S., & Barton F. E. 1989. *Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS): Analysis of Forage Quality*. U.S. Department of Agriculture, Agriculture Handbook No. 643 (revised with supplements), 110 p.
- Mauer L. J., & Bradley R. L. 2017. Moisture and total solids analysis. In Nielsen S. (Ed.) *Food Analysis*. Food Science Text Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_15.
- McClure W. F. 2006. Introduction. In Y. Ozaki., W. F. McClure., & A. A. Christy (Eds). *Near-*

- Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. (Chap. 1, pp. 4). Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN-13: 978-0-471-67201-2. DOI: 10.1002 / 9780470047705.
- McClure W. F., & Tsuchikawa S. 2006. Instrument. In Y. Ozaki., W. F. McClure., & A. A. Christy (Eds). Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Ttechnology. (Chap. 4, pp. 75). Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN-13: 978-0-471-67201-2. DOI: 10.1002 / 9780470047705.
- Melenteva, A., Galyanin, V., Savenkova, E., & Bogomolov, A. 2016. Building global models for fat and total protein content in raw milk based on historical spectroscopic data in the visible and short-wave near infrared range, Food Chemistry), doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.127>.
- Miller N. J., & Miller J. C. 2002. Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson Educación. S.A., Madrid. Pág. 239.
- Naprta M. 2015. Rise in “healthier”, “better for you” chocolate. *Agro FOOD Industry Hi Tech* - vol 26(3):16-18. Consultado en: https://www.teknoscienze.com/Contents/Riviste/Sfogliatore/AF3_2015/files/assets/basic-html/index.html#18.
- Nielsen S. S. 2017. Introduction to Food Analysis. In: Nielsen S. (eds) Food Analysis. Food Science Text Series. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_1.
- Nollet, L. M. L. 2019. Partial Least Squares Regression. In N. C. Basantia., L. M. L. Nollet & M. Kamruzzaman (Eds). Hyperspectral Imaging Analysis and Applications for Food Quality. (1st ed., Chap. 7, pp. 109). Taylor & Francis Group. ISBN: 9781351805940.
- Ozaki Y., Morita S., & Du. Y. 2006. Spectral Analysis. In Y. Ozaki., W. F. McClure., & A. A. Christy (Eds). Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Technology. (Chap. 3, pp. 47-58). Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN-13: 978-0-471-67201-2. DOI: 10.1002 / 9780470047705.

- Ramis, R. G. y García, M. C. 2001. Quimiometría. Ed. Síntesis, S.A. Madrid, España. pp. 140-210.
- Salas T. J y Hernández L. Y. 2015. Cacao, una aportación de México al mundo. Revista de la Academia Mexicana de Ciencias, Vol. 66-3. ISSN 1405- 6550. www.revistaciencia.amc.edu.mx.
- Sandorfy C., Buchet R., & Lachenal G. 2006. Principles of Molecular Vibrations for Near-Infrared Spectroscopy. In Y. Ozaki., W. F. McClure., & A. A. Christy (Eds). Near-Infrared Spectroscopy in Food Science and Ttechnology. (Chap. 2, pp. 11). Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN-13: 978-0-471-67201-2. DOI: 10.1002 / 9780470047705.
- SCFI. 1964. Norma Mexicana NMX-F-059-1964, que establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado chocolate tipo amargo; su clasificación y especificaciones, destinado para el consumo humano. Diario Oficial de la Federación, 12 de marzo de 1964. México. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-059-1964.PDF>. (consultado el 28 de julio de 2020).
- SCFI. 1982. Norma Mexicana NMX-F-60-1982, que establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado chocolate con leche y sus variedades, destinado para el consumo humano. Diario Oficial de la Federación, 3 de septiembre de 1982. México. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-060-1982.PDF> (consultado el 28 de julio de 2020).
- SCFI. 1964. NMX-F-061-1964 que establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado chocolate para mesa; su clasificación y especificaciones, destinado para el consumo humano. Diario Oficial de la Federación. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-061-1964.PDF>
- Shenk J. S., Workman J. J., & Westerhaus M. O. 2008. Aplicación de NIR Spectroscopy to Agricultural Products. In D. A. Burns & E. W. Ciurczak (Eds). Near-Infrared Analysis. Practical Spectroscopy (3th ed., Chap. 17, pp-347-387). Tylor & Francis Group. ISBN 978-08493-7393-0.

- Talbot G. (2015). Chocolate and Cocoa Butter-Structure and Composition. En N. Garti & N. R. Widlak (Ed.). Butter and Related Compounds (pp.1-13). ISBN: 9780128043448. <https://books.google.com.mx/books?id=xRxCgAAQBAJ>
- Vann, L., Layfield, J. B., & Sheppard, J. D. 2017. The application of near-infrared spectroscopy in beer fermentation for online monitoring of critical process parameters and their integration into a novel feedforward control strategy. *Journal of the Institute of Brewing*. doi:10.1002/jib.440.
- Wang L., Sun D., Pu H., & Cheng J. 2017. Quality analysis, classification, and authentication of liquid foods by near-infrared spectroscopy: A review of recent research developments, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57:7, 1524-1538, DOI:10.1080/10408398.2015.1115954.
- Wold S., Ruhe A., Wold H., & Dunn W. J. 1984. The collinearity problem in linear regression. The partial least squares (PLS) approach to generalized inverses. *Society for Industrial and Applied Mathematics*. Vol. 5, No. 3, 736-738.
- Yang H., & Trewin J. 2004. *Multivariate Statistical in Quality Management*. Mc Graw Hill, (1st ed., Chap. 1, pp. 12-13), ISBN: 0071432086.

CAPÍTULO III: VALOR NUTRACÉUTICO DE CHOCOLATES ELABORADOS CON TRES VARIEDADES DE CACAO DE TABASCO, MÉXICO

RESUMEN

Las características físicas y químicas de los productos alimenticios se especifican en estándares, y para el chocolate la norma mexicana establece los límites mínimos y máximos permisibles en su composición nutrimental. La hipótesis es que el aumento de la concentración de cacao aumenta el aporte de energía y reduce los carbohidratos. El objetivo del estudio es cuantificar el valor nutraceutico, con base en las características fisicoquímicas de los chocolates tipo amargo con concentraciones de cacao desde 30 hasta 100 % y de tres variedades (forastero, trinitario y criollo), del estado de Tabasco, México. Los parámetros estudiados fueron humedad, ceniza, proteína, grasa, aporte energético y carbohidratos; y se calificó el cumplimiento con los valores establecidos en las normas mexicanas. Los chocolates de este estudio, con 70 % cacao, se compararon con una prueba de medias. Y con una prueba t-Student, se compararon los valores promedio de los chocolates de este estudio y los de Venezuela con 70 ± 3 % cacao. Se realizó un análisis gráfico del aporte nutraceutico de los chocolates de esta investigación. Solo los chocolates con 50 % de cacao forastero presentaron valores de humedad que superan lo establecido en la norma. En las cenizas, el mínimo y máximo se consideran en los límites establecidos por la norma; pero en chocolates con 60 % de cacao forastero y de trinitario y con 80 % de criollo, el contenido de cenizas supera lo establecido en la norma. Solo las muestras con 30 % de cacao, en cada una de las tres variedades, presentan valores de proteína menores al mínimo establecido en la norma. Los chocolates superan el mínimo de grasa establecido en la norma. Se definieron las propiedades con diferencias significativas entre los chocolates elaborados con las tres variedades de cacao (70 ± 3 %) de Tabasco, México; así como su similitud o diferencia estadística con los chocolates de otro país. Se describen los aportes de carbohidratos, energía y grasa; y en función del porcentaje de cacao se define el 70 % de cacao como el punto de equilibrio en los chocolates estudiados, donde se inicia la obtención de mayor energía y menor aporte de carbohidratos. Se establecieron modelos de regresión lineal simple para estimar el contenido de carbohidratos, energía y grasa, a partir del porcentaje de cacao, sin importar la variedad de cacao. Con base en los promedios generales, los chocolates de cacao forastero al presentan los mejores atributos nutraceuticos.

Palabras clave: carbohidratos, contenido energético, grasa, chocolate amargo, cacao.

ABSTRACT

The physical and chemical characteristics of food products are specified in standards, and for chocolate the Mexican standard establishes the minimum and maximum permissible limits in its nutritional composition. The hypothesis is that increasing the concentration of cocoa increases energy intake and reduces carbohydrates. The objective of the study is to quantify the nutraceutical value, based on the physicochemical characteristics of bitter-type chocolates with cocoa concentrations from 30 to 100 % and of three varieties (forastero, Trinidadian and Creole), from the state of Tabasco, Mexico. The parameters studied were moisture, ash, protein, fat, energy intake and carbohydrates; and compliance with the values established in Mexican standards was rated. The chocolates of this study with 70 % cocoa, were compared with a test of means. And with a t-Student test, the average values of the chocolates in this study and those of Venezuela with 70 ± 3 % cocoa were compared. A graphic analysis of the nutraceutical contribution of the chocolates in this investigation was carried out. Only the chocolates with 50 % foreign cocoa presented humidity values exceeding that established in the standard. In ashes, the minimum and maximum are considered within the limits established by the standard; but in chocolates with 60 % foreign and Trinidadian cocoa and 80 % criollo, the ash content exceeds what is established in the standard. Only the samples with 30 % cocoa, in each of the three varieties, present protein values lower than the minimum established in the standard. The chocolates exceed the minimum fat established in the standard. The properties with significant differences between the chocolates made with the three varieties of cocoa (70 ± 3 %) from Tabasco, Mexico; as well as its statistical similarity or difference with the chocolates of another country. The contributions of carbohydrates, energy and fat are described; and depending on the percentage of cocoa, 70 % cocoa is defined as the equilibrium point in the studied chocolates, where the obtaining of greater energy and less carbohydrate intake begins. Simple linear regression models were established to estimate the content of carbohydrates, energy and fat, from the percentage of cocoa, regardless of the variety of cocoa. Based on overall averages, foreign cocoa chocolates have the best nutraceutical attributes.

Keywords: carbohydrates, energy content, fat, dark chocolate, cocoa.

3.1. INTRODUCCIÓN

El chocolate se elabora con granos de la mazorca del árbol de cacao (*Theobroma Cacao L.*) luego de someterse a un proceso de fermentación, secado y tostado (Moros *et al.*, 2007). Aunque no siempre fue de esta manera porque los mayas lo utilizaban para preparar la bebida “*xocoatl*” (Parabhakaran, 2010), de la cual se originó la palabra chocolate.

El chocolate y sus derivados se clasifican como productos con alta densidad energética respecto a su volumen, ya que una barra de 100 g contiene carbohidratos, lípidos y proteínas, un equivalente aproximado de 500 calorías; además de algunas vitaminas del complejo B con relación directa a su valor nutricional (Parabhakaran, 2010). Un chocolate regular contiene 64.8 % de carbohidratos, 29.2 % de grasa, 4.7 % de proteína, y 11 mg g⁻¹ Na, 300 mg g⁻¹ P, 38 mg g⁻¹ K, 100 mg g⁻¹ Ca y 140 mg g⁻¹ Mg; además, hay teobromina y cafeína, responsables de efectos estimulantes (Parabhakaran, 2010; Torres-Moreno *et al.*, 2015).

El contenido de cada nutriente en el chocolate depende del porcentaje de cacao que contenga; cuando este aumenta se presenta un incremento en el contenido de grasa y una disminución de los carbohidratos, de manera proporcional (Vázquez *et al.*, 2019). Por tanto, los chocolates con mayor contenido de sólidos de cacao tienen un aporte energético de 9 cal g⁻¹ (Torres-Moreno *et al.*, 2015). Lo anterior, significa que tienen un efecto positivo en la salud debido a las propiedades nutricionales de los lípidos y se consideran alimentos funcionales (Jambrak & Skevin, 2017).

Algunos estudios indican que no genera cambios en el perfil lipídico plasmático. La grasa de cacao se compone de aproximadamente 33 % de ácido esteárico, 25 % de ácido palmítico y 33 % de grasa monoinsaturada, y tiene un efecto neutro en los niveles de colesterol, ya que tan solo aporta 1 mg g⁻¹ de este (Rull *et al.*, 2015).

En cuanto a los carbohidratos, la sacarosa es el segundo constituyente que más calorías aporta al chocolate (4 cal g⁻¹), además de conferirle estabilidad, volumen y uniformidad en la distribución de sabor (Gerschenson *et al.*, 2017). El hecho de que la sacarosa pueda contribuir con las propiedades reológicas del chocolate la convierte en un parámetro de calidad para la fabricación de este producto (Gerschenson *et al.*, 2017).

Las fluctuaciones de glucosa en el periodo postprandial se asocian con un aumento de los niveles de insulina y lípidos en plasma, que contribuyen al desarrollo de la disfunción endotelial; y se incrementa el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2 (Lee 2007; Giacco *et al.*, 2016).

En la actualidad las investigaciones se están orientando en los beneficios cardiovasculares como la regulación de la presión arterial y la función endotelial (Higginbotham & Taub, 2015; Kerimi y Williamson, 2015; Naprta, 2015) y la nutrición, del cacao y el chocolate (Afoakwa, 2010); y esto justifica realizar estudios para conocer la composición proximal del chocolate. La cual es de interés para el área de la salud, en la industria alimentaria para el desarrollo de productos con mayor valor comercial, control de calidad, y/o fines reglamentarios. El análisis proximal es el método implementado para estimar las cantidades relativas de humedad y cenizas que aportan masa al organismo y también de las que contribuyen al contenido total de energía como las proteínas, lípidos y carbohidratos (Thangaraj, 2016).

En la presente investigación, la hipótesis a comprobar es que el aumento de la concentración de cacao aumenta el aporte de energía y reduce los carbohidratos. Por lo tanto, el objetivo del estudio fue cuantificar el valor nutracéutico de los chocolates tipo amargo con distintas concentraciones de cacao en tres variedades distintas (forastero, trinitario y criollo), del estado de Tabasco, México.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Muestras

El estudio se realizó con un diseño descriptivo, transversal, prospectivo y no experimental (Méndez *et al.*, 2014). Para ello, se prepararon, un total 120 barras de chocolate de 50 g, correspondiendo a concentraciones de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % de cacao para cada una de las tres variedades (forastero, trinitario y criollo) con 5 repeticiones; mediante un método no probabilístico por conveniencia y se realizaron las pruebas en una ocasión. La concentración de cacao, mínima y máxima, en las muestras, es para cumplir lo establecido en la Norma Oficial Mexicana: NMX-F-061-1964 (SCFI. 1964), para chocolates para de mesa, amargo, semi-amargo y dulce.

3.2.2. Pretratamiento de muestras

Para obtener un tamaño de partícula de ~ 0.600 mm de \varnothing , cada una de las barras de chocolate se pasó a través de un rallador de acero inoxidable, y se tamizaron en una malla No. 30 ASTM (tamiz de acero inoxidable de la marca MONT INOX). Todas las muestras se almacenaron en frascos de vidrio grado alimenticio, a una temperatura promedio de 20 °C, hasta su análisis.

3.2.3. Análisis proximales

Se consideraron cinco parámetros para la caracterización de los chocolates: 1) humedad (H) NMX-F-083-1986 (SE (CTNN) 1986), 2) cenizas (C) NMX-F-607-NORMEX-2013 (NORMEX 2013), 3) grasa (G) por el método Soxhlet NMX-F-615-NORMEX-2018 (NORMEX 2018), 4) proteínas (P) (nitrógeno) por el método semi-micro Kjeldahl (método propio del Laboratorio Agroindustrial, Suelo, Planta y Agua del Colegio de Postgraduados); 5) carbohidratos (Carboh) calculados por diferencia, $100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa})$ (FAO, 2003) y 6) el valor energético en kilocalorías ($\text{kcal} = [(4 \times \text{proteínas}) + (4 \times \text{carbohidratos}) + (9 \times \text{grasa total})]$) (FAO, 2003).

3.2.4. Análisis estadístico

Los datos del análisis proximal se describen con el promedio de las cinco repeticiones en cada concentración de cacao y se calificó el cumplimiento con los valores establecidos en las normas mexicanas para chocolates.

Para los chocolates de este estudio con 70 % cacao, se realizó una comparación de medias a través de la prueba Tukey-Test ($\alpha \leq 0.05$) (R Core Team, 2018). Y para comparar los valores promedio de los chocolates de este estudio, y los realizados en Venezuela por Vázquez *et al.* (2019); se utilizó la prueba t-Student ($\alpha \leq 0.05$) (Montgomery, 2013) (SPSS Version 22.0). Esta comparación fue para chocolates con 70 ± 3 % cacao.

Finalmente se realizó un análisis gráfico del aporte nutracéutico (grasa, carbohidratos y contenido energético) de los chocolates elaborados con cada una de las tres variedades y con diferentes concentraciones de cacao. Se establecieron modelos de regresión lineal simple de la grasa - % de cacao, carbohidratos - % de cacao, contenido energético - % de cacao y grasas-carbohidratos - % de cacao.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido promedio de humedad en las muestras de chocolate estudiadas (1.51 ± 0.71 %; un mínimo de 0.70 % y un máximo de 3.92 %) fue menor al límite máximo permisible (2.0 %) establecido en la NMX-F-059-1964 (SCFI. 1964). Sin embargo, las muestras correspondientes a chocolate preparado con 50 % de cacao forastero presento valores de humedad que superan lo establecido en la norma oficial, antes mencionada.

Con respecto al contenido de las cenizas, el promedio fue de 1.71 ± 0.66 % (con un mínimo de 0.10 % y un máximo 2.84 %); contenido que puede considerar dentro de los límites establecidos por la norma NMX-F-059-1964 (SCFI. 1964), con límites entre 1.3 y 2.5 %, para chocolates amargo, semi-amargo y dulce; cabe señalar que las muestras con concentraciones de 60 % de cacao forastero y trinitario, 80 % de criollo, el contenido de cenizas supera lo establecido en la norma. En cuanto a la grasa, el promedio fue de 41.75 ± 10.74 % (un mínimo de 24.61 % y un máximo de 62.56 %). Todas las muestras de chocolate cumplen con el mínimo de grasa (22 %) establecido en la NMX-F-059-1964 (SCFI. 1964); lo cual indica que los chocolates fueron elaborados con cacao sin desgrasar.

El contenido de proteína en chocolate de mesa, establecido en la NMX-F-061-1964 (SCFI. 1964), es de 7.25 %, 5.8 % y 4.5 % para chocolates amargo, semi-amargo y dulce, respectivamente. Las muestras empleadas en esta investigación tienen un contenido promedio de proteína de 7.58 ± 2.38 % (un mínimo de 3.80 % y un máximo de 13.03 %). Solo las muestras con 30 % de cacao, en cada una de las tres variedades, presenta valores menores al mínimo establecido en la norma; esto puede atribuirse a que en esta concentración el grano de cacao no es una fuente importante de proteína. Además, las muestras de estudio corresponden a chocolate tipo amargo, semi-amargo y dulce sin aditivos que pudieran contribuir con proteína en las muestras elaboradas con el contenido mínimo de cacao permitido por la normativa oficial.

Los chocolates de cacao forastero con 60 %, las de trinitario con 70 % de cacao, y las de criollo con 80 % cacao, presentan valores que superan a los establecidos en la norma correspondiente. Algunos autores indican que las semillas de cacao después de ser sometidas a los procesos de fermentación, secado, tostado y conchado para la elaboración de chocolate, presentan cambios en su composición, como la disminución de la concentración de proteína (Moros *et al.*, 2007; Afoakwa, 2010; Hartel *et al.*, 2018; Toker *et al.*, 2019).

En cuanto a carbohidratos, el porcentaje promedio fue 47.40 ± 13.80 (un mínimo de 21.98 y un máximo de 69.58 %). Todas las muestras, de cada una de las tres variedades, y en todas las concentraciones de cacao, cumplen con las especificaciones (máx. 70 %), establecido en la NMX-F-059-1964 (SCFI. 1964). Respecto al contenido energético, las kilocalorías promedio fueron 595.72 ± 50.65 (un mínimo de 516.09 y un máximo de 696.56, kcal). El promedio de los chocolates de este estudio es superior al promedio (528.98 ± 18.34 kcal) reportado por Suzuki et al (2011), cuando estudiaron la composición química de cinco marcas de chocolate negro regular de Brasil.

3.3.1. Comparaciones entre los chocolates con 70 ± 3 % cacao de este estudio, y con los de Venezuela

La comparación se realizó entre chocolates con una diferencia de ± 3 % de cacao, en su composición. En el Cuadro 3.1 se muestran los estadísticos de la comparación de los chocolates, de las tres variedades de Tabasco, con 70 % de cacao. En la humedad hay diferencias del chocolate con cacao forastero y son estadísticamente iguales el trinitario y criollo. Para proteína son estadísticamente diferentes los chocolates con cacao forastero y criollo. La ceniza, grasa, carbohidratos y kcal presentan diferencias significativas entre los chocolates de cada una de las tres variedades de cacao, con 70 %.

En el comparativo de los chocolates al 70 % de cada una de las tres variedades, el chocolate con cacao forastero fue superior en el contenido de ceniza, proteína, grasa y aporte energético; pero con menor aporte de carbohidratos. La ceniza es importante porque en su composición están todos los minerales como P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, etcétera (datos no presentados). Con base en los resultados analíticos, los chocolates con cacao forasteros presentan los mejores atributos nutricionales.

Cuando se compararon los chocolates con 70 % de cacao forastero, trinitario o criollo, de México con los de Venezuela (Vásquez *et al.*, 2019), Gran Samán (70 % cacao) (Cuadro 3.2) y Apamate (73.5 % cacao) (Cuadro 3.3), se demostraron diferencias estadísticas en todos parámetros. Con base en lo anterior se concluye que con los análisis proximales realizados fue posible demostrar la influencia de la región de origen del cacao y tipo de elaboración de los chocolates, como lo indican Cambrai *et al.* (2010) y Kongor *et al.* (2016). Pero se debe escalar la investigación para la caracterización de propiedades más específicas del cacao, por ejemplo: teobromina, cafeína, polifenoles, etc.

Cuadro 3.1. Comparación de la composición de los chocolates de Tabasco, México preparados con cada una de las tres variedades, al 70 % cacao.

Parámetro	Humedad	Ceniza	Proteína	Grasa	Carbohidratos	Kcal
------(%)-----						
Trinitario	1.54±0.10 b	1.78±0.01 c	7.47±0.39 ab	40.32±0.43 c	48.89± 0.74 a	588.30±2.25 c
Forastero	2.93±0.11 a	2.06±0.02 a	7.75±0.24 a	47.27±0.69 a	39.98± 0.87 c	616.37±3.21a
Criollo	1.60±0.13 b	1.91±0.01 b	7.23±0.12 b	43.64±0.41 b	45.62± 0.35b	604.16±2.33 b

H = humedad; C = ceniza; P =proteína; G = grasa; Carb = carbohidratos; Kcal= Energía. Letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey-Test ($\alpha \leq 0.05$)).

Cuadro 3.2. Comparación de los chocolates de cada una de las tres variedades de cacao de Tabasco con el chocolate comercial Gran Saman de Venezuela. 70 % de cacao en todos los chocolates.

Variedad	H	V. de R.	C	V. de R.	P	V. de R.	G	V. de R.	Carb	V. de R.
------(%)-----										
Forastero	2.93±0.11	2.4±0.2*	2.06±0.02	2.3±0.10*	7.75±0.24	6±1*	47.27±0.69	37.9±0.2*	39.98±0.87	51±1*
Trinitario	1.54±0.10	2.4±0.2*	1.78±0.39	2.3±0.10*	7.47±0.39	6±1*	40.32±0.44	37.9±0.2*	48.89±0.75	51±1*
Criollo	1.60±0.14	2.4±0.2*	1.91±0.12	2.3±0.10*	7.23±0.12	6±1*	43.64±0.41	37.9±0.2*	45.62±0.35	51±1*

H = humedad; C = ceniza; P = proteína; Carb = carbohidratos, V. de R. = valor de referencia. *Significancia $t_{\alpha/2,4} = 2.776$.

Cuadro 3.3. Comparación entre los chocolates de tres variedades de cacao de Tabasco con el chocolate comercial Apamate (73.5 % cacao) de Venezuela.

Variedad	H	V. de R.	C	V. de R.	P	V. de R.	G	V. de R.	Carb	V. de R.
------(%)-----										
Forastero	2.93±0.11	2.3±0.2*	2.06±0.02	2.06±0.03*	7.75±0.24	7±2*	47.27±0.69	44.3±0.7*	39.98±0.87	44±1*
Trinitario	1.54±0.10	2.3±0.2*	1.78±0.39	2.06±0.03*	7.47±0.39	7±2*	40.32±0.44	44.3±0.7*	48.89±0.75	44±1*
Criollo	1.60±0.14	2.3±0.2*	1.91±0.03	2.06±0.03*	7.23±0.12	7±2*	43.64±0.41	44.3±0.7*	45.62±0.35	44±1*

H = humedad; C = ceniza; P = proteína; Carb = carbohidratos, V. de R. = valor de referencia. *Significancia $t_{\alpha/2,4} = 2.776$.

3.3.2. Aporte nutracéutico de los chocolates con diferentes concentraciones de cacao

En esta sección se realizó un análisis gráfico del comportamiento de la grasa, carbohidratos y energía, con respecto al porcentaje de cacao en los chocolates; con objeto de identificar el valor nutracéutico de los chocolates.

La Figura 3.1 muestra cómo el contenido de grasa de los chocolates tiene un incremento proporcional al aumento del porcentaje de cacao. El modelo de regresión lineal simple establecido confirma esta linealidad, con un valor de R^2 superior a 0.9. Este comportamiento es debido a que la manteca de cacao (grasa de cacao) está directamente relacionada con el contenido de sólidos de cacao. La grasa es un componente esencial en la nutrición básica; el estudio de Torres-Moreno *et al.* (2015), confirma que, debido a su perfil de ácidos grasos, el chocolate puede considerarse una fuente importante de ácidos grasos saturados, especialmente el ácido esteárico, del cual se indica que tiene un efecto neutro en la salud.

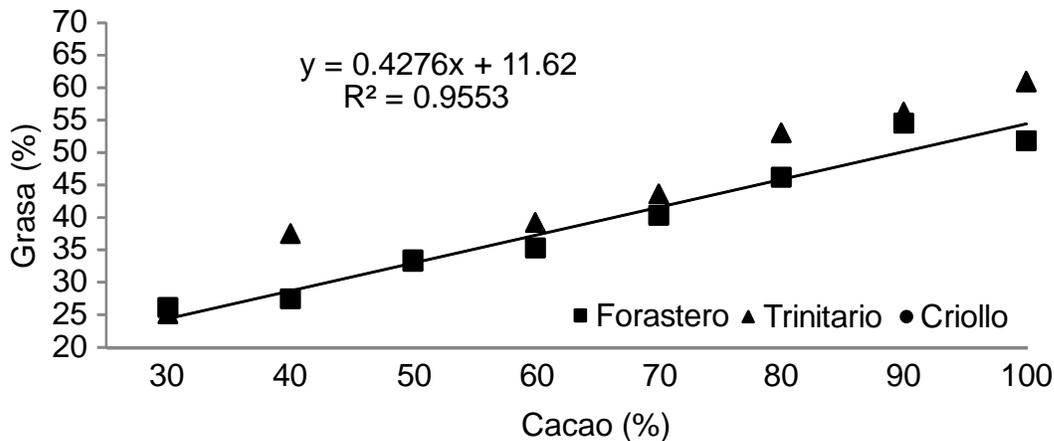


Figura 3.1. Relación entre el contenido de cacao y grasas, en muestras de chocolates en concentraciones de 30 a 100 %, y de tres variedades de cacao de Tabasco, México.

Los carbohidratos (azúcares) por el contrario muestran una tendencia a disminuir respecto del incremento del porcentaje de cacao en formulación de los chocolates, como se observa en la Figura 3.2. Se estableció un modelo de regresión lineal simple con una R^2 superior a 0.9, con una pendiente negativa. Cuando el contenido de cacao en los chocolates se incrementa, se les denomina “chocolate oscuro” (Afoakwa *et al.*, 2008); y las tendencias actuales, relacionan el consumo de estos chocolates con beneficios a la salud y así lo afirman Grassi *et al.* (2005), quienes demostraron que el chocolate oscuro rico en polifenoles disminuye la presión arterial y mejora la sensibilidad a la insulina en personas sanas.

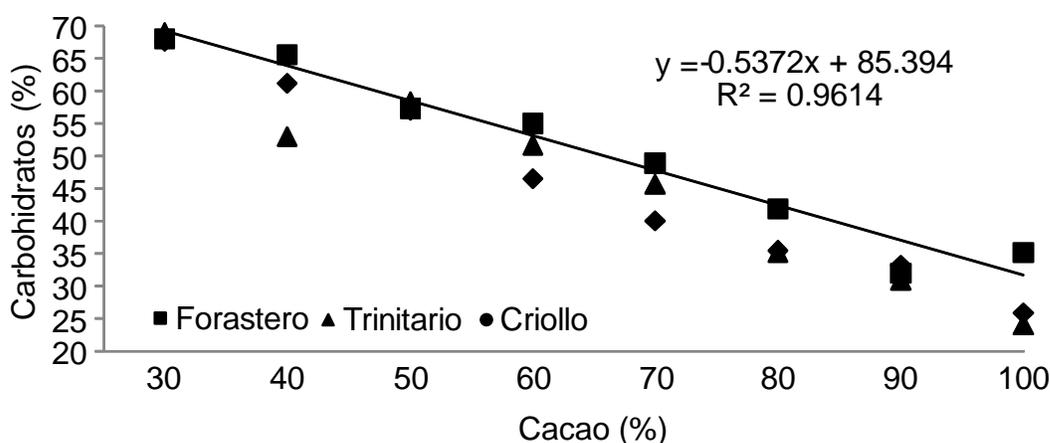


Figura 3.2. Relación entre el contenido de cacao y carbohidratos, en muestras de chocolates en concentraciones de 30 a 100 %, y de tres variedades de cacao de Tabasco, México.

En la Figura 3.3 se observa que las kilocalorías tienen una tendencia positiva y lineal respecto al contenido de cacao. El modelo de regresión lineal simple tiene una R^2 superior a 0.9, el valor energético es aportado por la grasa del cacao, la cual tiene un mayor poder calórico. Esto no supone un efecto adverso a la salud; ya que en estos casos la inanición de hidratos de carbono induce al cuerpo a obtener energía a través de los cuerpos cetónicos (Dearlove *et al.*, 2019). Las cetonas proporcionan una fuente de carbono oxidable alternativo a la glucosa para el cerebro; y actúan como señales metabólicas, regulando el uso y la movilización de otros sustratos de combustible (Dearlove *et al.*, 2019). Lo que contribuye a un impacto positivo en la salud por la disminución de los niveles de glucosa, pero con ganancia de obtener la energía (Torres-Moreno *et al.*, 2015).

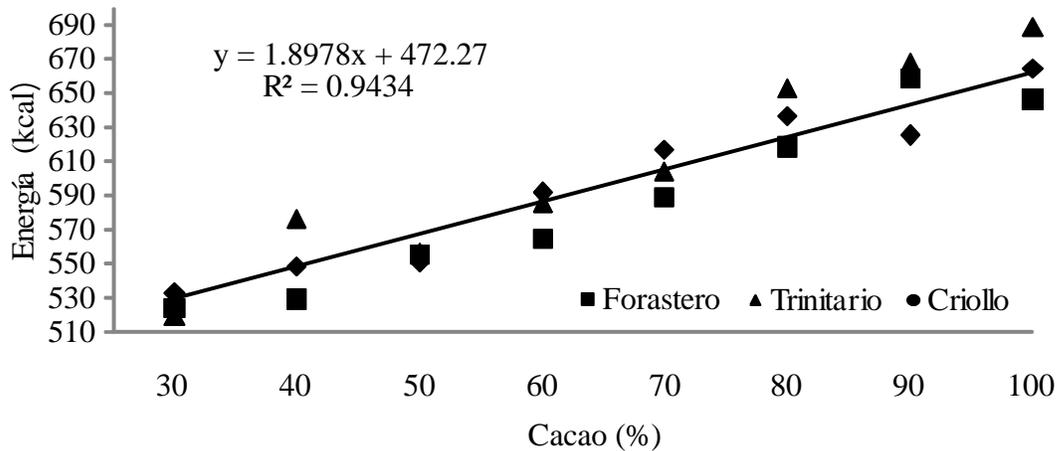


Figura 3.3. Relación entre el contenido de cacao y el contenido de energía, en muestras de chocolates en concentraciones de 30 a 100 %, y de tres variedades de cacao de Tabasco, México.

La Figura 3.4 muestra cómo los porcentajes de carbohidratos y grasa son inversamente proporcionales, con respecto al porcentaje de cacao. Considerando el comportamiento de estas dos propiedades en las muestras de chocolate de este estudio, se define un punto de equilibrio en muestras con un contenido de 70 % cacao. A partir de este porcentaje se obtiene más energía y menor contenido de carbohidratos.

Esto indica que, chocolates con 70 % de cacao o más, proporcionan mayores beneficios para la salud. Lo anterior es debido a las propiedades nutricionales de los lípidos (grasa); y es la razón por la cual los chocolates con porcentajes altos de cacao (≥ 70 %) se consideran alimentos funcionales, como lo indican Jambrak y Skevin (2017).

Finalmente, los chocolates de esta investigación (sin importar la variedad), se clasifican como oscuros. Y de acuerdo con Kerimi y Williamson (2015) el consumo de estos chocolates con 70 % o más de cacao tiene beneficios cardiovasculares en la regulación de la presión arterial y la función endotelial.

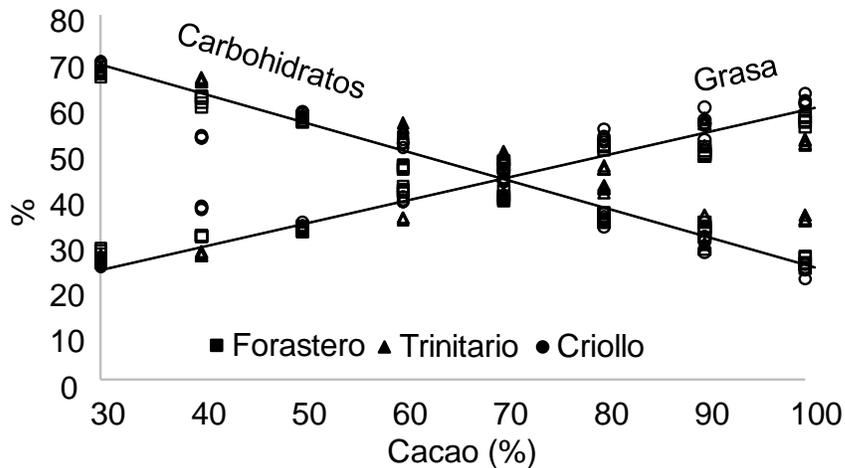


Figura 3.4. Relación entre el contenido de grasas y carbohidratos, en muestras de chocolates en concentraciones de 30 a 100 %, y de tres variedades de cacao de Tabasco, México.

En el presente estudio se definieron los aportes de carbohidratos, aporte energético y grasa, todos en función del porcentaje de cacao. Con los modelos de regresión lineal simple establecidos pueden estimarse, con exactitud, estas propiedades nutraceuticas de los chocolates, a partir del porcentaje de cacao, y sin importar la variedad. Para fines de salud, los beneficios de consumir chocolates con concentraciones altas (70 % o más) de cacao en lugar de aquellos que están constituidos en su mayoría por sacarosa; se corresponde con lo establecido por Lettieri- Barbato *et al.* (2012); Oliveira y Nilsson (2017) con “chocolate oscuro”, en presentaciones de 60 g, quienes indican que ingerir en un consumo moderado de chocolate oscuro rico en antioxidantes y flavonoides, mejora la circulación coronaria y aumenta significativamente las defensas antioxidantes plasmáticas en humanos sanos; con un aporte de energía suficiente para las actividades cotidianas.

3.4. CONCLUSIONES

En este estudio se definieron las propiedades con diferencias significativas entre los chocolates elaborados con las tres variedades de cacao (70 ± 3 %) de Tabasco, México; así como su similitud o diferencia estadística con los chocolates de otro país. Se describen los aportes de carbohidratos, energía y grasa; y en función del porcentaje de cacao; y se define el 70 % de cacao como el punto de equilibrio en los chocolates estudiados donde se inicia la obtención de mayor energía y menor aporte de carbohidratos. Se establecieron modelos de regresión lineal simple para estimar el contenido de carbohidratos, energía y grasa, a partir del porcentaje de cacao, aunque el chocolate se produzca con la variedad forastero, trinitario o criollo. En el comparativo de los chocolates al 70 % de cada una de las tres variedades, los chocolates de cacao forastero presentan los mejores atributos nutraceuticos; con mayor contenido de ceniza (mineral), proteína, grasa y aporte energético; pero con menor aporte de carbohidratos.

3.5. LITERATURA CITADA

- Afoakwa E. O., Paterson A., Fowler M., and Vieira J. 2008. Characterization of melting properties in dark chocolates from varying particle size distribution and composition using differential scanning calorimetry. *Food Research International* 41: 751–757. doi:10.1016/j.foodres.2008.05.009.
- Afoakwa E. O. 2010. *Chocolate Production and Consumption Patterns*. Chocolate Science and Technology. Wiley-Blackwell, United Kingdom. 275 p. ISBN: 978-1-405-19906-3.
- Cambrai A., C. Marcic, S. Morville, P. S. houer, F. Bindler, and E. Marchioni. 2010. Differentiation of chocolates according to the cocoa's geographical origin using chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* 58:1478–1483. DOI:10.1021/jf903471e.
- Dearlove D. J., Olivia K. F., & Clarke K. 2019. Context is key: exogenous ketosis and athletic performance. *Current Opinion in Physiology* 10:81-89. <https://doi.org/10.1016/j.cophys.2019.04.010>.
- FAO. 2003. *Food energy – methods of analysis and conversion factors*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Food and Nutrition Paper 77. Report of a technical workshop. Rome, Italy. 87 p.
- Gerschenson, L. N., A. M. Rojas, and E. N. Fissore. 2017. Carbohydrates. In Galanakis C. M. (Edit.), *Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques*. Academic Press, Greece. pp. 39–101. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805257-0.00003-X>.
- Giacco R., G. Costabile and G. Riccardi. 2016. Metabolic effects of dietary carbohydrates: The importance of food digestion. *Food Research International* 88:336–341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.10.026>.
- Grassi D., C. Lippi, S. Necozione, G. Desideri and C. Ferri. 2005. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *Am J Clin Nutr* 81:611–614. <https://academic.oup.com/ajcn/article-abstract/81/3/611/4648949>.

- Hartel R. W., J. H. von Elbe and R. Hofberger. 2018. *Confectionery Science and Technology*. Springer Nature, Switzerland. 536 pp. ISBN 978-3-319-61740-4. DOI 10.1007/978-3-319-61742-8
- Higginbotham, E. and Taub, P.R. 2015. Cardiovascular Benefits of Dark Chocolate? *Curr Treat Options Cardio Med* 17-54. DOI 10.1007/s11936-015-0419-5.
- IBM Corp. Released 2013. *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0*. Armonk, NY: IBM Corp.
- Jambrak A. R. and D, Skevin. 2017. Lipids. In Galanakis C. M. (Edit.), *Nutraceutical and Functional Food Components: Effects of Innovative Processing Techniques*. Academic Press, Greece. pp. 103–128. ISBN: 9780128052570.
- Kerimi A. and G. Williamson. 2015. The cardiovascular benefits of dark chocolate. *Vascular Pharmacology* 71:11–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vph.2015.05.011>.
- Kongor J. E., M. Hinneh, D. Van de Walle, E. Ohene A., P. Boeckx and K. Dewettinck. 2016. Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile — A review. *Food Research International* 82:44-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>.
- Lee W. A. 2007. Carbohydrates. *Reference Module in Biomedical Sciences*: 1-12. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60056-X>.
- Lettieri-Barbato D., D. Villaño, B. Beheydt, F. Guadagni, I. Trogh and M. Serafini. 2012. Effect of ingestion of dark chocolates with similar lipid composition and different cocoa content on antioxidant and lipid status in healthy humans. *Food Chemistry* 132:1305–1310. doi:10.1016/j.foodchem.2011.11.109.
- Méndez R., I. D. Namihira G., L. Moreno A. y C. Sosa de M. 2014. *El Protocolo de Investigación: lineamientos para su elaboración y análisis*. Editorial Trillas. México, D. F.
- Montgomery, D. 2013. *Design and analysis of experiments*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. (8th ed., Chap. 3, pp. 97-100). ISBN 978-1-118-14692-7.

- Moros J., F. A. Iñón, S. Garrigues and M. de la Guardia. 2007. Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples. *Analytica Chimica Acta* 581(1):215-222. doi:10.1016/j.aca.2006.11.020.
- Naprta M. 2015. Rise in “healthier”, “better for you” chocolate. *Agro FOOD Industry Hi Tech* - vol 26(3):16-18. Consultado en: https://www.teknoscienze.com/Contents/Riviste/Sfogliatore/AF3_2015/files/assets/basic-html/index.html#18.
- NORMEX. 2013. NMX-F-607-NORMEX-2013 que establece el método de prueba para la determinación de cenizas totales en alimentos en general y bebidas no alcohólicas. Diario Oficial de la Federación, 8 de agosto de 2013. México. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5311757&fecha=27/08/2013 (consultado el 28 de julio de 2020).
- NORMEX. 2018. NMX-F-615-NORMEX-2018 que establece el método de prueba para determinar la cantidad de grasas presentes en materias primas, producto en proceso y terminado de origen vegetal y animal. Diario Oficial de la Federación, 22 de mayo de 2019. México. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5565079&fecha=05/07/2019 (consultado el 28 de julio de 2020)
- Oliveira D. y A. Nilsson. 2017. Effects of dark-chocolate on appetite variables and glucose tolerance: A 4 week randomised crossover intervention in healthy middle aged subjects. *Journal of Functional Foods* 37:390–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.010>.
- Prabhakaran N., K. P. 2010. Cocoa (*Theobroma cacao* L.). *The Agronomy and Economy of Important Tree Crops of the Developing World*. Elsevier 368 pp. ISBN: 978-0-123-84677-8.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

- Rull G., Z. N. Mohd-Zain, J. Shiel, M. H. Lundberg, D. J. Collier, A. Johnston, T. D. Warner and R. Corder. 2015. Effects of high flavanol dark chocolate on cardiovascular function and platelet aggregation. *Vascular Pharmacology* 71:70-78.
- SCFI. 1964. Norma Mexicana NMX-F-059-1964, que establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado chocolate tipo amargo; su clasificación y especificaciones, destinado para el consumo humano. *Diario Oficial de la Federación*, 12 de marzo de 1964. México. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-059-1964.PDF>. (consultado el 28 de julio de 2020)
- SCFI. 1964. NMX-F-061-1964 que establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado chocolate para mesa; su clasificación y especificaciones, destinado para el consumo humano. *Diario Oficial de la Federación*. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-061-1964.PDF>.
- SE (CTNN). 1986. NMX-F-083-1986 que establece el método para determinar la humedad en productos alimenticios con rango de secado de 95° a 105°C. *Diario Oficial de la Federación*, 14 de julio de 1986. México. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-083-1986.PDF> (consultado el 28 de julio de 2020).
- Suzuki R. M., P. F. Montanher., J. V. Visentainer., & N.E. de Souza. 2011. Proximate composition and quantification of fatty acids in five major Brazilian chocolate brands. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 31(2): 541-546. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=395940105040>.
- Thangaraj P. 2016. *Pharmacological Assays of Plant- Based Natural Products*. Springer, Switzerland 188 pp. ISBN 978-3-319-26810-1. DOI 10.1007/978-3-319-26811-8
- Toker O. S., I. Palabiyikb and N. Konarc. 2019. Chocolate quality and conching. *Trends in Food Science & Technology* 91:446–453. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.047>.

- Torres-Moreno M., E. Torrecasana, J. Salas-Salvadó and C. Blanch. 2015. Nutritional composition and fatty acids profile in cocoa beans and chocolates with different geographical origin and processing conditions. *Food Chemistry*, 166:125-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.141>.
- Vásquez C., G. Henríquez, J. V. López, E. K. Penott-Chang, A. J. Sandoval y A. J. Müller. 2019. The effect of composition on the rheological behavior of commercial chocolates. *LWT - Food Science and Technology* 111:744-750. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.101>.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS, VALORES ENERGÉTICOS Y PROXIMAL DE CHOCOLATES PREPARADOS CON TRES VARIEDADES DE CACAO MEDIANTE ESPECTROCOPIA VIS-NIR-SWIR.

RESUMEN

La calidad del chocolate está en función de las sustancias que lo constituyen y las concentraciones en las que estas se encuentran. Y se requiere de análisis químicos para conocer su constitución proximal y valor energético. Sin embargo, la tendencia de la Química Analítica es resolver el problema planteado con el menor esfuerzo posible. Por eso se estableció como objetivo de este estudio generar modelos de calibración VIS-NIRS-SWIRT para la determinación de carbohidratos, valor energético y proximal de chocolates preparados con cada una de las tres variedades de cacao (forastero, trinitario y criollo), en concentraciones de cacao de 30 a 100 %. La hipótesis fue que la tecnología NIR genera información útil y suficiente para generar modelos de calibración para estimar la concentración de cada uno de los parámetros estudiados. Los espectros (VIS-NIR-SWIR), obtenidos directamente de las barras de chocolate, es información útil y suficiente para establecer modelos de predicción, PLS, de los carbohidratos, el valor energético y contenido proximal (humedad, ceniza, grasa y proteína). Los estadísticos obtenidos en la validación interna y externa de los modelos indican que los modelos son adecuados para predecir los carbohidratos, el valor energético y los proximales. Los modelos generados tienen aplicaciones en sistema en tiempo real (*On line*). La tecnología NIR tiene la ventaja de que no modifica las propiedades físicas, químicas o biológicas de los chocolates; no genera residuos de laboratorio, y el análisis es más rápido y económico que cuando se realizan con métodos convencionales o normalizados.

Palabras clave: modelación, modelación NIRS, algoritmo PLS, calificadores estadísticos.

ABSTRACT

The quality of chocolate is a function of the substances that make it up and the concentrations in which they are found. For which, chemical analysis is required to know its proximal constitution and energy value. However, the tendency of Analytical Chemistry is to solve the problem with the least possible effort. That is why the objective of this study was established to generate VIS-NIRS-SWIR calibration models for the determination of carbohydrates, energy and proximal value of chocolates prepared with each of the three varieties of cocoa (forastero, trinitario and criollo), in concentrations of cocoa from 30 to 100 %. The hypothesis was that NIR technology generates useful and sufficient information to generate calibration models to estimate the concentration of each of the studied parameters. The spectra (VIS-NIR-SWIR), obtained directly from the chocolate bars, are useful and sufficient information to establish prediction models, PLS, of carbohydrates, energy value and proximal content (moisture, ash, fat and protein). The statistics obtained in the internal and external validation of the models indicate that the models are suitable for predicting carbohydrates, energy value and proximal values. The models generated have real-time system applications (On line). NIR technology has the advantage that it does not modify the physical, chemical or biological properties of the chocolates; it does not generate laboratory waste, and the analysis is faster and cheaper than when performed with conventional or standardized methods.

Keywords: modeling, NIRS modeling, PLS algorithm, statistical qualifiers.

4.1. INTRODUCCIÓN

La calidad del chocolate está en función de las diferentes sustancias que lo constituyen y las concentraciones en las que estas se encuentran; y se requieren métodos analíticos para conocer su constitución proximal y valor energético. En la actualidad, se requiere de métodos analíticos rápidos, de bajo costo y poco uso de infraestructura de laboratorio, y robustos para evaluar la composición completa del chocolate en un solo análisis; y que facilite la toma de decisiones en tiempo real. Con objeto de comercializar productos de calidad (Da Costa, 2009; Krämer *et al.*, 2015).

McQueen *et al.* (1995) establecieron dos métodos, uno a través de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR, siglas en inglés) y otro mediante espectroscopia de reflexión total atenuada infrarroja medio con transformada de Fourier (FTIR-ATR) para la cuantificación de humedad, grasa y proteína en queso. De esta forma demostraron la versatilidad y confiabilidad de esta técnica para la determinación de propiedades químicas de interés nutricional en alimentos.

El negocio de alimentos tiene interés en utilizar la tecnología de infrarrojo cercano y herramientas de análisis multivariado para controlar el proceso de fabricación y el contenido de varios productos como helados, mayonesa, leche en polvo y chocolate; para detectar adulteración y fraude en los alimentos, que afecta las propiedades químicas del producto, pone en riesgo la salud del consumidor e infringen la reglamentación (Da Costa, 2009; Queral-Vásquez *et al.*, 2018; Márquez *et al.*, 2019). El potencial de este método es debido a que es una técnica rápida, no invasiva en la cual la muestra requiere mínima o ninguna preparación, reduce el error analítico y no utiliza reactivos (y por ello, no genera desechos químicos); con potencial para sustituir tecnologías como la cromatografía líquida, y de gas (Teye *et al.*, 2013; Queral-Vásquez *et al.*, 2018).

Una comparación entre los métodos convencionales y la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS), demuestra que el análisis convencional de proteínas, carbohidratos y grasas consume un tiempo total de 10, 4 y 5 horas, respectivamente; mientras que NIRS realiza simultáneamente todas las determinaciones en 20 s (Deng *et al.*, 2018). La literatura informa que se ha utilizado NIRS satisfactoriamente en la predicción de parámetros nutricionales en chocolate (como sacarosa, lactosa, grasa y humedad) y propiedades reológicas (viscosidad y rendimiento), sacarosa en masa de chocolate y calidad de granos de cacao fermentado, así como compuestos volátiles en granos sin fermentar o secados al sol (Moros *et al.*, 2007; Da Costa, 2009; Álvarez *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue generar modelos de calibración que permitieran la determinación simultánea de carbohidratos, valor energético y proximal en chocolates preparadas con tres variedades de cacao (forastero, trinitario y criollo).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Muestras

El estudio se realizó con un diseño descriptivo, transversal, prospectivo y no experimental (Méndez *et al.*, 2014). Para ello, se prepararon, un total 120 barras de chocolate de 50 g, correspondiendo a concentraciones de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % de cacao para cada una de las tres variedades (forastero, trinitario y criollo) con 5 repeticiones; mediante un método no probabilístico por conveniencia y se realizaron las pruebas en una ocasión. La concentración de cacao, mínima y máxima, en las muestras, es para cumplir lo establecido en la Norma Oficial Mexicana: NMX-F-061-1964 (SCFI. 1964), para chocolates para de mesa, amargo, semi-amargo y dulce.

4.2.2. Pretratamiento de las muestras

Para el análisis con métodos convencionales se obtuvo un tamaño de partícula menor a 0.600 mm de Ø. Cada una de las barras de chocolate se pasó a través de un rallador de acero inoxidable, y se tamizaron en una malla No. 30 ASTM (tamiz de acero inoxidable de la marca MONT INOX). Las muestras se almacenaron en frascos de vidrio grado alimenticio, a una temperatura promedio de 20 °C, hasta su análisis.

4.2.3. Análisis proximales

Se consideraron cinco parámetros para la caracterización de los chocolates: 1) humedad (H) NMX-F-083-1986 (SE (CTNN) 1986), 2) cenizas (C) NMX-F-607-NORMEX-2013 (NORMEX 2013), 3) grasa (G) por el método Soxhlet NMX-F-615-NORMEX-2018 (NORMEX 2018), 4) proteínas (P) (nitrógeno) por el método semi-micro Kjeldahl (método propio del Laboratorio Agroindustrial, Suelo, Planta y Agua del Colegio de Postgraduados); 5) carbohidratos (Carboh) calculados por diferencia, $100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa})$ (FAO, 2003) y 6) el valor energético en kilocalorías ($\text{kcal} = [(4 \times \text{proteínas}) + (4 \times \text{carbohidratos}) + (9 \times \text{grasa total})]$) (FAO, 2003).

4.2.4. Obtención de Espectros Combinados VIS-NIR-SWIR

El equipo que se utilizó para generar los espectros fue un espectrofotómetro de reflectancia en el infrarrojo cercano-infrarrojo de onda corta, marca Foss NIRSystems, modelo Versatile Agri Analyzer 6500 System II Vertical Type 461008. Para obtener los registros fue utilizado el programa ISISCAN (Infrasoft. 2008. ISIScan, Quick Start Guide for System II Analyzer. Version 2.81. Infrasoft International LLC. State College, PA USA).

La medición se realizó en modo reflectancia, en el intervalo, VIS-NIR-SWIRT, de longitud de 400-2498 nm (a intervalos de ondas pares), para un total de 1050 datos por muestra. La celda porta muestras son rectangulares de 24 cm³ con ventana de cuarzo (muestras de 50 g). La medición espectral fue directamente en la barra de chocolate colocada en la celda porta muestra con una temperatura de ~20 oC.

4.2.5. Construcción y validación de los modelos

Con los espectros VIS-NIRS-SWIR y con los datos de carbohidratos, valor energético y proximales (humedad, ceniza, grasa y proteína), se generados los modelos de calibración (regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Se utilizó el programa Pirouette 4.11 (Chemometrics Software versión 4.5 para Windows de infometrix Inc. Copyrigh, 2007).

Para la construcción y validación de los modelos PLS, las muestras se dividieron a través de un muestreo aleatorio estratificado (Ross, 2010) en dos grupos: 1) el 90 % de las muestras para la construcción y validación interna, de cada modelo; y 2) el 10 % de las muestras, para la validación externa de cada modelo.

En la validación interna de cada modelo se utilizaron los calificadores estadísticos: error estándar de calibración (SEC), error estándar de validación cruzada (SECV), coeficiente de correlación de la validación (r_{VAL}), coeficiente de determinación (R^2_{CAL}) y coeficiente de correlación múltiple (RSQ). Y para la validación externa se utilizaron los calificadores estadísticos: error estándar de validación (SEV), error estándar de predicción (SEP), desviación predictiva residual (RPD = Relación SD/SEVC), y coeficiente de correlación (r) (Cuadro 4.1 y 4.2). En cada grupo se presentan los estadísticos de la composición de las muestras media (Media) y desviación estándar (DE).

Cuadro 4.1. Calificadores estadísticos para selección y validación interna de los modelos de calibración PLS.

Calificador	Ecuación
R^2 Cal (coeficiente de determinación múltiple)	$R = 1 - \frac{SEC^2}{SD^2}$
SEC (erros estándar de calibración)	$SEC = \sqrt{\frac{1}{N_c - 1} \sum_{i=1}^{N_c} (\hat{y}_i - y_i)^2}$
SECV (error estándar de validación cruzada)	$SEC = \frac{\sqrt{\sum_i (y_i - \bar{Y})^2}}{N}$
r VAL (coeficiente de correlación de la validación)	$r = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{(\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \bar{x}^2)(\sum_{i=1}^n y_i^2 - n \bar{y}^2)}}$

Cuadro 4.2. Calificadores estadísticos para la validación externa selección de los modelos de calibración PLS.

Calificador	Ecuación
SEP (error estándar de predicción)	$SEP = \sqrt{\frac{1}{N_p - 1} \sum_{i=1}^{N_p} (\hat{y}_i - y_i - bias)^2}$
RPD (relación de desviación de la predicción)	$RPD = SD/SEC$
SEPC (error estándar de predicción corregido por BIAS)	$SEPC = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2 \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}}{N}}}{N - 1}$
SEC/SEP	$SEC/SEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i - \hat{C}_i)^2}{n}}$

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 4.1 se presentan los espectros VIS-NIR-SWIR de las 120 muestras de chocolate, de las tres variedades de cacao del estado de Tabasco, México. Los espectros son de 120 muestras, con 1050 datos/muestra, con lo cual se obtiene una matriz de 126000 datos.

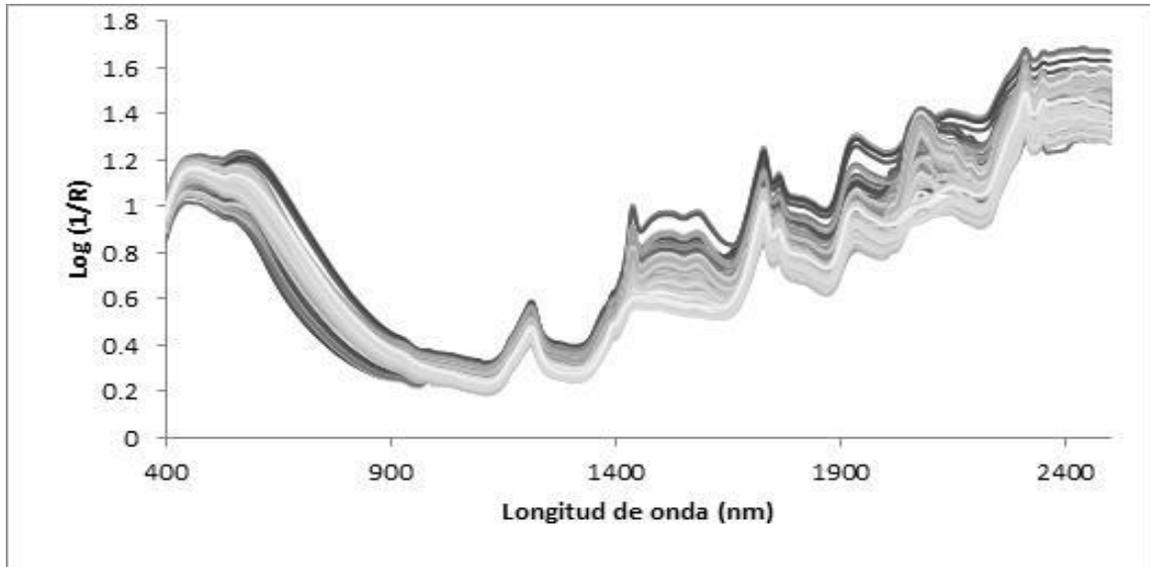


Figura 4.1. Espectros VIS-NIR-SWIR del total de las muestras de chocolate (120), preparadas con cada una de las 3 variedades de cacao de Tabasco, México.

4.3.1. Validación de los modelos de calibración

En el Cuadro 4.3 se presentan los tratamientos matemáticos y estadísticos para la construcción, con los espectros VIS-NIR-SWIR, y selección (mediante validación interna), de los modelos de calibración PLS para estimar las propiedades de chocolate elaborados con cada una de las tres variedades de cacao. No se eliminaron muestras en la construcción y validación de cada modelo. Los factores definen la variabilidad explicada, lo cual es necesario para los modelos PLS que se basan en factores. Con el número de factores óptimos (Cuadro 4.3), los indicadores estadísticos cumplen para aceptar cada modelo; ya que el porcentaje de varianza explicada es superior al 90 % en todos los parámetros.

Cuadro 4.3. Tratamientos matemáticos y estadísticos para la construcción y selección de los modelos PLS, para propiedades de chocolate elaborado con tres variedades de cacao.

Modelo	Algoritmo	Pre-procesado	Transformaciones	Factores óptimos
Humedad	PLS	Media central	1 Der	5
Ceniza	PLS	Media central	SNV+Normalizado+1 Der	7
Proteína	PLS	Rango escalado	SNV+Log10 +Normalizado+1 Der	4
Grasa	PLS	Media central	MSC+Log10+Smooth + 1 Der	6
Carbohidratos	PLS	Media central	MSC+Smooth+1 Der	7
Kilocalorías	PLS	Rango escalado	SNV+ Normalizado	7

PLS = regresión por mínimos cuadrados parciales, SNV = varianza normal estándar, MSC = corrección de dispersión multiplicativa, Smooth = Suavizado, Der = Derivada.

4.3.1.1. Validación interna

El tratamiento estadístico y matemático fue suficiente para establecer modelos de predicción para el contenido de carbohidratos, valor energético y proximal. Los datos de la validación interna de los modelos se presentan en el Cuadro 4.4. Para esta etapa se utilizó el 90 % de las muestras de chocolate.

Los indicadores estadísticos de la validación interna R_{CAL} y r_{VAL} presentan valores cercanos a la unidad (mayores a 0.99), lo cual indican buena relación lineal. Sin embargo, la humedad presenta un valor en el intervalo de 0.80 a 0.90; lo cual puede deberse a la baja precisión del método de referencia, que es una medición gravimétrica. Con base en la propuesta de Saha *et al.* (2017) los modelos de calibración que tienen un valor para R^2 superior a 0.91 se consideran "excelentes" para hacer predicciones; y para la humedad, con un valor para R^2 entre 0.82 y 0.90, indica que la capacidad de predicción es "buena". El SEC es menor que el SECV en todos los parámetros validados de cada modelo, lo cual indica buena capacidad predictiva.

En la Figura 4.2 es una representación gráfica de la correlación entre el valor de referencia y el valor estimado por el modelo de predicción PLS, de los parámetros medidos (carbohidratos, valor energético y proximal). A excepción de la humedad, cuya r_{CAL} es menor a 0.9; el resto de los modelos presentan buen ajuste de los puntos correlacionados, lo cual se corresponde con los R_{CAL} y r_{VAL} cercanos a la unidad.

Cuadro 4.4. Parámetros estadísticos de validación interna del grupo de entrenamiento para la construcción de modelos de predicción de la composición de los chocolates de Tabasco, México.

Parámetro	n	SEP	SEVC	R cal	r val	Media	DE	Rango
Humedad	108	0.36	0.40	0.87	0.84	1.51	0.72	3.22
Ceniza	108	0.09	0.09	0.99	0.99	1.75	0.60	2.74
Proteína	108	0.52	0.56	0.98	0.97	7.59	2.39	9.23
Grasa	108	1.56	1.76	0.99	0.99	4.80	10.81	37.95
Carbohidrato	108	1.89	2.18	0.99	0.99	47.35	13.88	47.60
kcal	108	7.95	8.50	0.99	0.99	595.97	51.04	180.47

N: Número de muestras; SEC: Error estándar de calibración; SEVC: Error estándar de validación cruzada; R_{CAL} : Coeficiente de determinación; r_{VAL} : Coeficiente de correlación; DE: Desviación estándar.

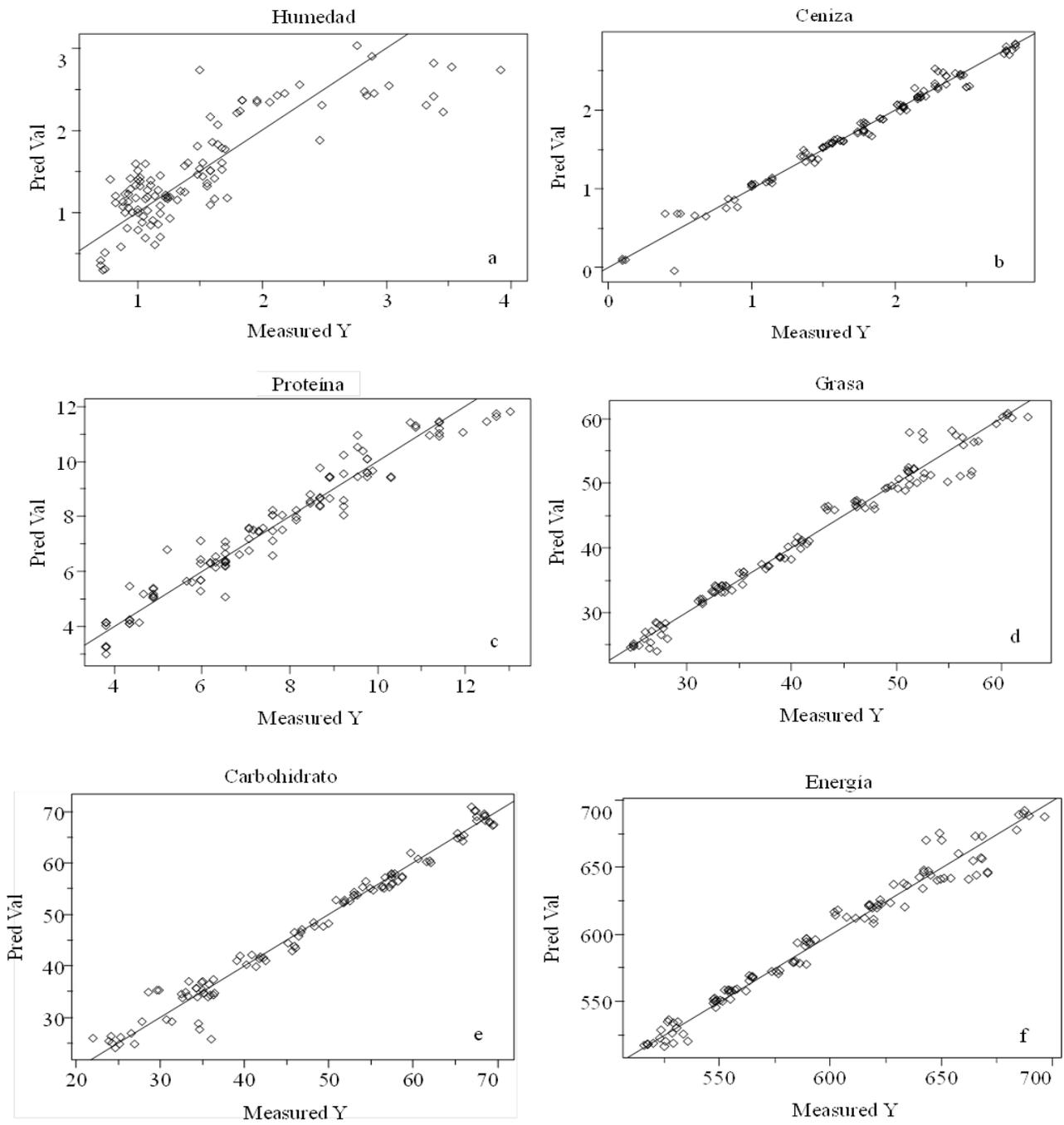


Figura 4.2. Correlación entre el valor de referencia y el valor estimado por el modelo de predicción PLS, de los parámetros medidos (carbohidratos, valor energético y proximal) en chocolates.

4.3.1.2. Validación externa

En la Figura 4.3 es la representación gráfica de la correlación entre los valores predicho por el modelo y los valores de referencia, de los parámetros modelados de los chocolates; y en el Cuadro 4.5 se presentan los estadísticos de la validación externa. El valor de r , para humedad, es 0.90, el resto son valores superiores a 0.90. La representación gráfica muestra una tendencia lineal, que se confirma con las r cercanas a la unidad. Entre más cercanos y distribuidos estén los puntos con relación a la recta, mejor es la capacidad de predicción del modelo.

El error estándar de validación (SEV) presenta valores muy bajos para los parámetros humedad, ceniza, proteína; pero son superiores a la unidad para grasa, carbohidratos y kcal. La relación SEC/SEP es alrededor de la unidad, lo cual, indica que el modelo presente buen ajuste.

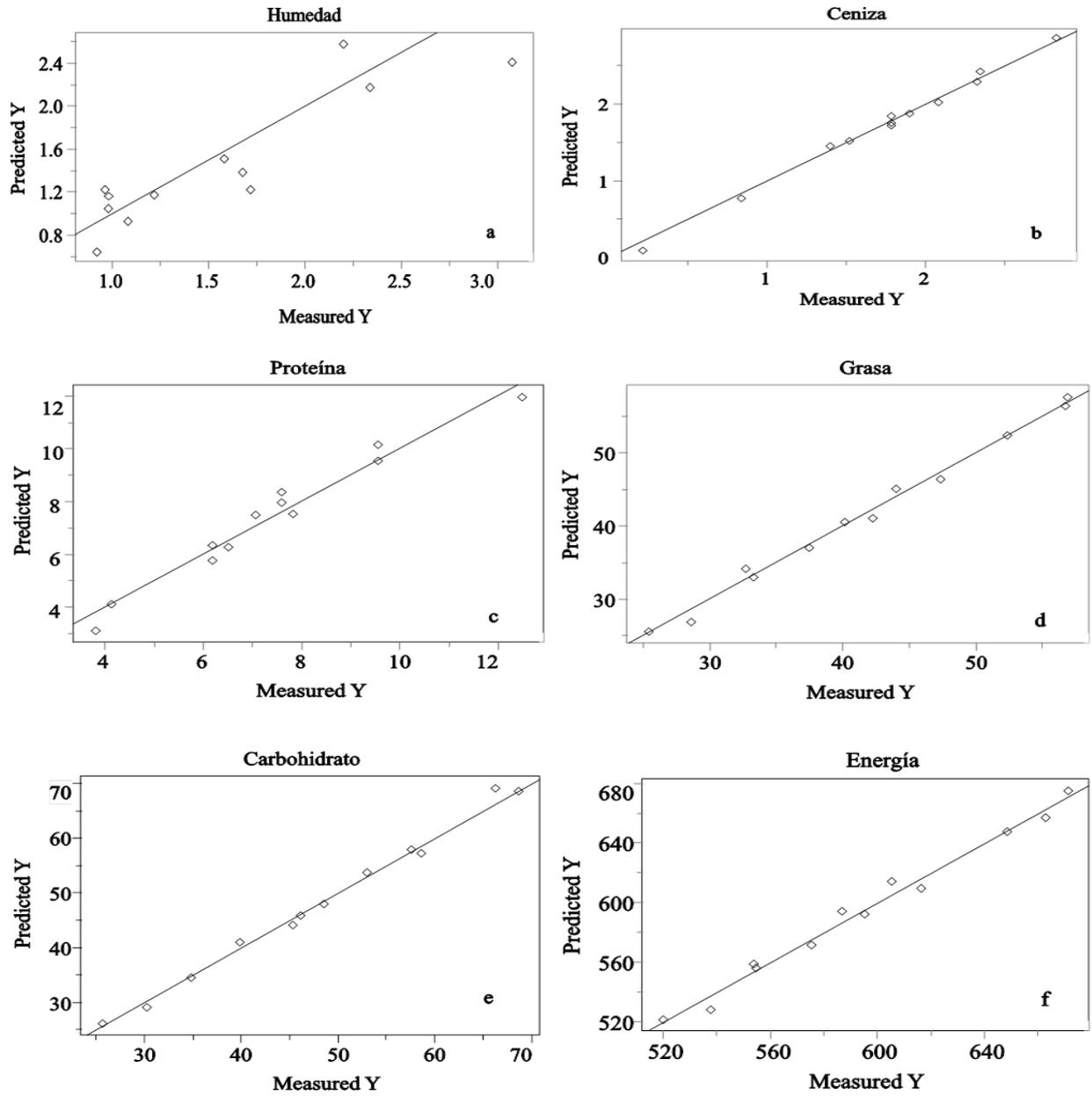


Figura 4.3. Correlación entre el valor de referencia y el valor estimado por el modelo de predicción, en la validación externa de los parámetros medidos (carbohidratos, valor energético y proximal) en chocolates.

Cuadro 4.5. Parámetros estadísticos de la validación externa de los modelos de predicción de la composición de los chocolates de Tabasco, México.

Parámetro	N	SEV	SEP	RPD	r	Media	DE	Rango
Humedad	12	0.40	0.31	1.82	0.90	1.56	0.68	2.16
Ceniza	12	0.09	0.06	7.03	1.00	1.73	0.69	2.60
Proteína	12	0.56	0.44	4.28	0.98	7.38	2.39	8.69
Grasa	12	1.76	0.89	6.13	1.00	41.44	10.50	31.48
Carbohidratos	12	2.18	1.15	6.38	1.00	47.89	13.67	43.06
kcal	12	8.50	5.47	6.00	0.99	594.02	49.08	151.17

N: número de muestras; SEV: error estándar de validación; SEP: error estándar de predicción; RPD: relación SD/SEVC; r: Coeficiente de correlación; DE: desviación estándar.

Respecto a los calificadores RPD, Nicolai *et al.* (2007) y Bellon-Maurel *et al.* (2010), indican que un RPD entre 1.5 y 2 significa que el modelo puede discriminar valores bajos de valores altos de la variable de respuesta; un valor entre 2 y 2.5 indica que son posibles predicciones cuantitativas gruesas, y un valor entre 2.5 y 3, o superior, corresponde a una precisión de predicción buena y excelente, respectivamente. Terhoeven-Ursemans *et al.* (2008) indican que $1.4 < RPD \leq 2$, es satisfactorio; mientras que un $RPD > 2$, es bueno.

El RPD obtenido en esta investigación es mayor a 2.0, excepto para la humedad (que es menor a 2). Con base en las escalas de RPD propuestas previamente, los modelos establecidos tienen buena capacidad de predicción en los parámetros modelados, de los chocolates de las tres variedades. Con lo cual, se confirma que los modelos de calibración son excelentes para predecir los carbohidratos, el valor energético y los proximales.

En el presente trabajo se obtuvieron modelos de calibración, a partir de los espectros VIS-NIR-SWIR, obtenidos con la tecnología NIR; para cuantificar carbohidratos, valor energético y la composición proximal (humedad, ceniza, grasa y proteína). Los calificadores estadísticos indican que los modelos establecidos tienen la capacidad para cuantificar estas propiedades en los chocolates, de cada una de las tres variedades de cacao, y en sus diferentes concentraciones; con resultados estadísticamente igual a los obtenidos con los métodos convencionales.

Con esta investigación se demuestra que la tecnología NIR generará información útil y suficiente para estimar las propiedades de los chocolates. Y como las mediciones fueron en las barras de chocolates sin ningún tratamiento previo, esto tiene aplicación en tiempo real (sistema *On Line*) y con ello, realizar el etiquetado por cada lote de producción de chocolates.

4.4. CONCLUSIONES

Los espectros VIS-NIR-SWIR, obtenidos directamente de las barras de chocolate, de cada una de las variedades de cacao (trinitario, criollo y forastero), y en distintas concentraciones, es información útil y suficiente para establecer modelos de predicción de los carbohidratos, el valor energético y contenido proximal (humedad, ceniza, grasa y proteína). Los estadísticos obtenidos en la validación interna y externa de los modelos, indican que son adecuados para predecir los parámetros estudiados. Los modelos generados tienen aplicaciones en sistema en tiempo real (*On line*). La aplicación de la tecnología NIR tiene la ventaja de que no modifica la composición global de la muestra (no cambian sus propiedades físicas, químicas o biológicas). Además de que no se generan residuos de laboratorio; y el análisis es más rápido y económico que cuando se realizan con métodos convencionales o normalizados (actualmente).

4.5. LITERATURA CITADA

- Álvarez C., Pérez E., Cros E., Lares M., Assemat S., Boulanger R., & Davrieux F. 2012. The use of near infrared spectroscopy to determine the fat, caffeine, theobromine and (-) epicatechin contents in unfermented and sundried beans of Criollo cocoa. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20, 307- 315. Doi: 10.1255/jnirs.990.
- Bellon M., V., Fernandez A. E., Palagos B., Jean, M. R., & McBratney, A. 2010. Critical review of chemometric indicators commonly used for assessing the quality of the prediction of soil attributes by NIR spectroscopy. *Trends Anal Chem* 29(9):1073-1081. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.05.006>
- Da Costa F, P. A. 2009. Rapid determination of sucrose in chocolate mass using near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 631, 206–211. doi:10.1016/j.aca.2008.10.049.
- Deng Y., Y. Wang, G. Zhong, & X. Yu. 2018. Simultaneous quantitative analysis of protein, carbohydrate and fat in nutritionally complete formulas of medical foods by near-infrared spectroscopy. *Infrared Physics & Technology* 93, 124-129. <https://doi.org/10.1016/j.infrared.2018.07.027>.
- FAO. 2003. Food energy – methods of analysis and conversion factors. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Food and Nutrition Paper 77. Report of a technical workshop. Rome, Italy. 87 pp.
- Krähmer A, A., Engel, D., Kadow, N., Ali, P., Umaharan, L., Kroh, W., & Schulz, H. 2015. Fast and neat – Determination of biochemical quality parameters in cocoa using near infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 181, 152–159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.084>.
- Márquez C, I. Ruisánchez & M. P. Callao. 2019. Qualitative and quantitative multivariate strategies for determining paprika adulteration with SUDAN I and II dyes. *Microchemical Journal*, 145, 686–692. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.034>.

- McQueen D. H, R. Wilson, A. Kinnunen & E. P. Jensen. 1995. Comparison of two infrared spectroscopic methods for cheese analysis. *Talanta*, 42, 2007- 2015. SSDI 0039-9140(95)01685-6.
- Moros J., F.A. Iñón, S. Garrigues & M. de la Guardia. 2007. Near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and neural networks for measuring nutritional parameters in chocolate samples. *Analytica Chimica Acta* 584, 215–222. doi:10.1016/j.aca.2006.11.020.
- Nicolai M. Bart, K. Beullens, E. Bobelyn, A. Peirs, W. Saeys, K. I. Theron & J. Lammertyna. 2007. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. *Postharvest Biology and Technology* 46, 99–118. doi:10.1016/j.postharvbio.2007.06.024.
- NORMEX. 2013. NMX-F-607-NORMEX-2013 que establece el método de prueba para la determinación de cenizas totales en alimentos en general y bebidas no alcohólicas. Diario Oficial de la Federación, 8 de agosto de 2013. México. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5311757&fecha=27/08/2013 (consultado el 28 de julio de 2020)
- NORMEX. 2018. NMX-F-615-NORMEX-2018 que establece el método de prueba para determinar la cantidad de grasas presentes en materias primas, producto en proceso y terminado de origen vegetal y animal. Diario Oficial de la Federación, 22 de mayo de 2019. México. Disponible en: https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5565079&fecha=05/07/2019 (consultado el 28 de julio de 2020)
- Pirouette Multivariate Data Analysis Software (Nº de versión 4.5). (2007). Windows. Bothell, Washington: Infometrix, Inc.
- Quelal-Vásconez M.A., É. Pérez-Esteve, A. Arnau- Bonachera, J. M. Barat & P. Talens. 2018. Rapid fraud detection of cocoa powder with carob flour using near infrared spectroscopy. *Food Control*. 92, 183-189. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.001>.
- Ross, S. 2010. Introduction to probability models. Amsterdam Boston: Academic Press, an imprint of Elsevier. ISBN: 978-0-12-374388-6.

- Saha U, D. Endale, P. G. Tillman³, W. C. Johnson, J. Gaskin, L. Sonon, H. Schomberg & Y. Yang. 2017. Analysis of Various Quality Attributes of Sunflower and Soybean Plants by Near Infrared Reflectance Spectroscopy: Development and Validation Calibration Models. *American Journal of Analytical Chemistry* 8, 462-492. DOI: 10.4236/ajac.2017.87035.
- SCFI. 1964. Norma Mexicana NMX-F-059-1964, que establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado chocolate tipo amargo; su clasificación y especificaciones, destinado para el consumo humano. *Diario Oficial de la Federación*, 12 de marzo de 1964. México. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-059-1964.PDF>. (consultado el 28 de julio de 2020).
- SCFI. 1964. NMX-F-061-1964 que establece las especificaciones que debe cumplir el producto denominado chocolate para mesa; su clasificación y especificaciones, destinado para el consumo humano. *Diario Oficial de la Federación*. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-061-1964.PDF>.
- SE (CTNN). 1986. NMX-F-083-1986 que establece el método para determinar la humedad en productos alimenticios con rango de secado de 95° a 105°C. *Diario Oficial de la Federación*, 14 de julio de 1986. México. Disponible en: <https://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-F-083-1986.PDF> (consultado el 28 de julio de 2020).
- Teye E., X. Huang, H. Dai & Q. Chen. 2013. Rapid differentiation of Ghana cocoa beans by FT-NIR spectroscopy coupled with multivariate classification. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 114, 183-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013>.
- Terhoeven-Urselmans T., H Schmidt., R. G Joergensen., and B Ludwig. 2008. Usefulness of near-infrared spectroscopy to determine biological and chemical soil properties: Importance of sample pre-treatment. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol 40., pp 1178-1188. ISSN 0038-0717. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.011>.

CAPÍTULO V. CONCLUSIÓN GENERAL

En este estudio, se cuantifico el contenido de grasa, el aporte energético y carbohidratos, en función del porcentaje de cacao; en chocolates elaborados con cada una de las tres variedades de cacao y en concentraciones de 30 a 100 % cacao. Con base en lo anterior se define el 70 % de cacao como el punto de equilibrio en los chocolates estudiados, donde se obtiene energía y menor contenido de carbohidratos.

Los espectros VIS-NIR-SWIR, obtenidos directamente de las barras de chocolate, de cada una de las variedades (trinitario, criollo y forastero), y en distintas concentraciones, es información útil y suficiente para establecer modelos de predicción de los carbohidratos, el valor energético y contenido proximal (humedad, ceniza, grasa y proteína). Los modelos generados tienen aplicaciones en sistema en tiempo real (*On line*). La aplicación de la tecnología NIR tiene la ventaja de que no modifica la composición global de la muestra (no cambian sus propiedades físicas, químicas o biológicas). Además de que no se generan residuos de laboratorio; y el análisis es más rápido y económico que cuando se realizan con métodos convencionales o normalizados.