

Evaluación biológica de la calidad de la proteína del chocolate oscuro en dietas para ratas

Biological evaluation of the quality of dark chocolate protein in diets for rats

Gabriela Cristina CHIRE-FAJARDO¹, Alejandrina SOTELO-MÉNDEZ², Arturo Alejandro URIBE-SALAS³, Milber Oswaldo UREÑA-PERALTA¹

1 Departamento de Ingeniería de Alimentos, Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

2 Departamento de Nutrición, Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

3 Escuela de Posgrado, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.

Recibido: 14/marzo/2024. Aceptado: 7/mayo/2024.

RESUMEN

Introducción: Los chocolates oscuros tienen alto contenido energético debido a la presencia de carbohidratos y grasas. La calidad proteica es fundamental para el desarrollo y mantenimiento celular del ser humano. El modelo animal (rata de laboratorio) brinda datos para continuar con mayores estudios.

Objetivo: Conocer la calidad de la proteína del chocolate oscuro (CO-70) en bioensayos con ratas en desarrollo.

Materiales y métodos: Se procesó el alimento (chocolate oscuro CO-70), se diseñaron las dietas isoproteicas e isocalóricas, para alimentar a ratas de laboratorio en desarrollo. Se recolectó peso y contenido de nitrógeno de: la rata, del alimento consumido, de la orina, de las heces, de la carcasa (luego del sacrificio) en tiempos establecidos según el tipo de bioensayo. Se efectuaron los cálculos respectivos para conocer: digestibilidad aparente (DA), valor biológico (VB), balance de nitrógeno (BN), razón proteínica neta (RPN), utilización neta de la proteína (UNP) y relación de eficiencia proteica (REP). La prueba T-student fue realizada para conocer diferencias significativas entre las dietas.

Resultados y discusiones: Las dietas T1 (Chocolate 50 %) y T2 (Chocolate 10 %) presentaron diferentes valores de bio-

ensayos (DA, BN, RNP), sólo el valor biológico (VB) fue similar para ambas dietas. Para la dieta T2 que incrementó peso, se reportó UNP y REP con valores de 58,71 y 2,13.

Conclusiones: Se conoció la calidad de la proteína del chocolate oscuro (CO-70), que sirve como ingrediente en preparaciones culinarias acompañadas con proteína de origen animal.

PALABRAS CLAVE

Bioensayos; proteína vegetal; dietas con cacao; balance de nitrógeno; modelo animal.

ABSTRACT

Introduction: Dark chocolates have high energy content due to the presence of carbohydrates and fats. Protein quality is essential for the cellular development and maintenance of human beings. The animal model (laboratory rat) provides data to continue with further studies.

Aim: To know the protein quality of dark chocolate (CO-70) in bioassays with developing rats.

Materials and methods: The food (dark chocolate CO-70) was processed, isoproteic and isocaloric diets were designed to feed developing laboratory rats. Weight and nitrogen content were collected from: the rat, the food consumed, the urine, the feces, the carcass (after sacrifice) at established times according to the type of bioassay. The respective calculations were carried out to know: apparent digestibility (AD), biological value (BV), nitrogen balance (NB), net protein ratio (NPR), net protein utilization (NPU) and protein efficiency

Correspondencia:
Gabriela Cristina Chire Fajardo
gchire@lamolina.edu.pe

ratio (PER). A T-student trial was carried out to determine significant differences between the diets.

Results and discussions: Diets T1 (Chocolate 50 %) and T2 (Chocolate 10 %) presented different bioassay values (DA, BN, NPR), only the biological value (BV) was similar for both diets. For the T2 diet that increased weight, NPU and PER were reported with values of 58.71 and 2.13.

Conclusions: The quality of dark chocolate (CO-70) protein was known, which serves as an ingredient in culinary preparations accompanied by protein of animal origin.

KEY WORDS

Bioassays; vegetal protein; cocoa diets; nitrogen balance; animal model.

ABREVIATURAS

CO-70: chocolate oscuro al 70% de cacao a partir de una fórmula optimizada.

DA: Digestibilidad aparente.

VB: Valor biológico.

BN: Balance de nitrógeno.

RPN: Razón proteínica neta.

UNP: Utilización neta de la proteína.

REP: Relación de eficiencia proteica.

DCA: Diseño completamente al azar.

T1: Tratamiento 1.

T2: Tratamiento 2.

C/pCh: Ratio caseína/proteína chocolate

CCN 51: varietal de cacao, colección castro naranjal 51.

ICS 6: varietal de cacao, imperial college selection 6.

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad se ha atribuido al chocolate propiedades saludables que lo han aproximado más hacia un uso terapéutico que alimentario, estudios indican que el chocolate tiene propiedades antioxidantes, efecto sobre la función plaquetaria e inflamatoria, además de tener un efecto en la presión arterial disminuyendo la presión arterial sistólica y diastólica¹. Según datos oficiales², la producción anual de chocolate en Perú para el año 2022 fue de 37 185 TN y la producción de cacao fue de 170 300 TN para el año 2022³; ambos casos continua en aumento.

La composición nutricional del chocolate es conocida, por su elevado aporte de calorías y antioxidantes. Sin embargo, la evaluación biológica, basada en la calidad de las proteínas, no

se refleja en la composición química, existiendo aún un vacío científico, por lo que es necesario realizar los bioensayos. La ganancia de peso o la retención de nitrógeno en las pruebas con el modelo animal (ratas de laboratorio), donde son alimentadas con dietas que contengan la proteína a analizar, son indicadores de la calidad de la proteína⁴. Así como: la digestibilidad aparente (DA), el valor biológico (VB), la razón proteínica neta (RPN), la utilización neta proteica (UNP) y la relación de eficiencia proteica (REP)⁵. Por lo que los objetivos del presente trabajo fueron: evaluar la calidad biológica proteica del chocolate oscuro en dos dietas de ratas de 25 días de edad.

MATERIALES Y METODOS

Preparación del alimento y formulación de la dieta experimental.

Se elaboró chocolate oscuro CO-70⁶, posteriormente se trituró, molió y homogenizó para su evaluación nutricional. Se conoció el contenido de energía total, teobromina y cafeína⁷. Se formularon dos dietas para el modelo animal en estudio, según el Requerimiento de Nutrientes de Animales de Laboratorio⁸ basados en una dieta de mantenimiento. Las dietas y el agua administradas *ad libitum* durante el periodo experimental según el tipo de bioensayo, considerando para las dietas un periodo de adaptación previo de cuatro días. Tratándose como tratamientos dietarios: T1 = dieta chocolate al 50 % y T2 = dieta chocolate al 10 %. Las dietas fueron isoproteicas al 10 % e isocalóricas con 400 kcal/100 g de alimento, aproximadamente. En la tabla 1 se muestra la formulación empleada para cada tratamiento.

Tabla 1. Formulación de las dietas experimentales

Ingredientes (g/100 g)	Dieta T1 (Chocolate 50 %)	Dieta T2 (Chocolate 10 %)
Chocolate oscuro CO-70 (en estudio)	50,46	10,00
Maicena (carbohidrato)	30,94	38,57
Caseína (proteína)	4,60	10,00
Azúcar blanca (Carbohidrato)	0,00	12,00
Manteca vegetal (Grasa)	0,00	13,96
Fibra	5,00	6,47
Mezcla de vitaminas	5,00	5,00
Mezcla de minerales	4,00	4,00
Total	100,00	100,00
Ratio caseína/proteína chocolate (C/pCh)	0,7	7,4

La composición proximal del chocolate oscuro CO-70, tuvo un contenido de proteína de $11,88 \pm 0,01$ %, grasa cruda de $35,12 \pm 0,04$ % y carbohidratos totales de $50,32 \pm 0,02$ %, aportando una energía de $555,90 \pm 0,10$ kcal en 100 gramos de chocolate. En alcaloides, un contenido de teobromina y cafeína en el chocolate de: $986,98 \pm 3,32$ mg/100 g y $167,67 \pm 7,15$ mg/100 g, respectivamente⁷, componentes importantes a ser analizados en una dieta con fines de bioensayos en un modelo animal.

Las dietas T1 (chocolate 50 %) y T2 (chocolate 10 %) fueron diseñadas con un contenido de proteínas de alrededor 10 %. El contenido de proteínas de las dietas tuvo que ser complementada con la adición de caseína (tabla 1). Entonces, para la dieta T1 se agregó 4,60 % de caseína y para la dieta T2 se le agregó 10,00 % de caseína.

La dieta T1 tuvo como ingredientes: chocolate oscuro CO-70, maicena, caseína, fibra, vitaminas y minerales, no se le agregó azúcar blanca ni manteca vegetal debido a que el chocolate oscuro en su formulación ya tenía azúcar blanca y el material graso fue la manteca de cacao. La dieta T2 contó con los mismos ingredientes anteriormente mencionados además de: azúcar blanca y manteca vegetal.

La composición nutricional de ambas dietas (T1 y T2) se muestra en la tabla 2. El contenido energético fue de 474,48 y 479,75 kcal/100 g, respectivamente, y de proteínas fue de 10,23 % y 11,77 %, respectivamente. Mientras que el contenido de teobromina y cafeína marcó una diferencia, la dieta T1 tuvo cinco veces más dichos componentes que la dieta T2.

Evaluación biológica proteica del chocolate

Se utilizaron 24 ratas macho de la raza *Holtzman* ($65,27 \pm 7,07$ g) de la sala de pruebas biológicas del Bioterio (Facultad de Zootecnia, UNALM), se utilizaron 16 para el grupo experimental y 8 para el grupo apteico. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos (T1 y T2) para la evaluación de dietas en los bioensayos, con cuatro repeticiones cada uno. Se utilizaron jaulas metabólicas individuales para

alojar a las ratas en evaluación, bebederos de vidrio y comederos de metal. Se usó una balanza electrónica para pesar: los animales, el alimento (20 g), los residuos de alimento y las excretas; una bureta para cuantificar el volumen de la orina; un calentador para mantener la temperatura del ambiente; un termo-hidrómetro para registrar temperatura y humedad relativa del ambiente; además de utensilios como: botellas, brochas, cucharas, bolsas y libreta de apuntes.

Se registró individualmente el peso de cada rata, peso de la dieta, peso de desperdicio de alimento, peso de excreción de heces y volumen de orina. Las muestras individuales de heces se molieron, mezclaron y homogeneizaron para ser analizadas y posteriormente determinar el nitrógeno, del mismo modo se procedió a mezclar y homogeneizar las muestras individuales de la orina para que posteriormente se analice el contenido de nitrógeno. En el último día se realizó el sacrificio de las ratas y se determinó el contenido de proteína de la carcasa.

La evaluación biológica proteica del chocolate oscuro se realizó sometiendo las ratas a las dos dietas (T1 y T2). Los bioensayos se calcularon de la siguiente forma: Con el registro del consumo de nitrógeno de la dieta en evaluación y la cantidad de nitrógeno presente en heces, se calculó la digestibilidad aparente (DA). Con el consumo de nitrógeno de la dieta en evaluación y la cantidad de nitrógeno presente en las excretas (heces y orina) se calculó el valor biológico (VB), adicionalmente se cuantificó el balance de nitrógeno (BN); en los tres casos con una duración de seis días. Con el registro de ganancia de peso, consumo diario de la dieta en evaluación y la ganancia de peso con la dieta apteica se calculó la razón proteínica neta (RPN). Con el consumo de nitrógeno y contenido de nitrógeno en la carcasa de la rata sometida a la dieta en evaluación, así como la dieta apteica se calculó la utilización neta de la proteína (UNP); en los dos casos con una duración de 14 días. Con el registro de ganancia de peso de la rata y consumo diario de la dieta en evaluación, se calculó el coeficiente de eficiencia proteica (REP) con una duración de 28 días⁵.

Tabla 2. Composición proximal estimada (base seca) de las dietas

Componente	T1	T2
Energía (kcal/100 g)	$474,48 \pm 2,26$	$479,75 \pm 0,14$
Proteína cruda (g/100 g)	$10,23 \pm 0,00$	$11,77 \pm 0,06$
Grasa cruda (g/100 g)	$18,58 \pm 0,48$	$17,63 \pm 0,07$
Carbohidratos totales (g/100 g)	$66,58 \pm 0,51$	$69,86 \pm 0,18$
Teobromina (mg/100 g)	$498,03 \pm 1,63$	$98,70 \pm 0,32$
Cafeína (mg/100 g)	$84,61 \pm 3,61$	$16,77 \pm 0,71$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las dos dietas (T1 = dieta chocolate 50 % y T2 = dieta chocolate 10 %) fueron evaluadas en los bioensayos: La digestibilidad aparente (DA), el valor biológico (VB), el balance de nitrógeno (BN), y la razón proteínica neta (RPN). La prueba de T-student fue realizada entre los tratamientos con el objetivo de contrastar las posibles diferencias en los resultados de los bioensayos en las dos dietas. Para los tratamientos que incrementaron significativamente el peso se evaluaron el UNP y el REP. En todos los casos los ensayos fueron expresados como media y desviación estándar de 4 réplicas ($n = 4$). El programa estadístico SAS® versión 9.4 fue utilizado para conocer el análisis estadístico.

RESULTADOS

Evaluación biológica proteica del chocolate

Los resultados muestran lo siguiente: La digestibilidad aparente (DA) fue del 56,82 % y 79,90 %, para las dietas T1 y T2, respectivamente, siendo la dieta T2 un 40 % más que la dieta T1, presentaron diferencias significativas (p -valor $\leq 0,05$). El valor biológico (VB) fue de 75,08 % y 78,32 %, para las dietas T1 y T2, respectivamente, no presentaron diferencias significativas (p -valor $> 0,05$). El balance de nitrógeno (BN) fue positivo, de 0,21 y 0,43, para las dietas T1 y T2, respectivamente, alcanzando la dieta T2 un 100 % más que la dieta T1, presentaron diferencias significativas (p -valor $\leq 0,05$). El RPN con valores de 0,80 y 3,43, para las dietas T1 y T2, respectivamente, siendo la dieta T2 el cuádruplo de la dieta T1, con diferencias significativas (p -valor $\leq 0,05$). El UNP y REP sólo se reportó para la dieta T2 con valores de 58,71 y 2,13, respectivamente. En los bioensayos: DA, BN y RPN, son mayores favorablemente para la dieta T2 con respecto a la dieta T1, como se aprecia en la Tabla 3.

Las ratas sometidas a la dieta T1 (chocolate 50 %) consumieron 71,52 g de alimento, perdieron peso, es decir se inició con 59,00 g y se terminó con 51,63 g. Sin embargo, la dieta T2 (chocolate 10 %), tuvo un menor contenido de chocolate en la formulación dio lugar a un mayor consumo cuyo valor fue de 70,98 g (p valor $> 0,05$), generando un incremento de peso en un 19 % (de 67,10 a 79,83 g) como se con-signa en la Tabla 4.

Tabla 3. Valores de bioensayos según dietas en evaluación

Bioensayo	T1	T2
Digestibilidad aparente, % (DA)	56,82 \pm 10,32 ^{a*}	79,90 \pm 2,95 ^{b*}
Valor biológico, % (VB)	75,08 \pm 20,21 ^{a*}	78,32 \pm 3,40 ^{a*}
Balance de nitrógeno (BN)	0,21 \pm 0,05 ^{a*}	0,43 \pm 0,04 ^{b*}
Razón proteínica neta (RPN)	0,80 \pm 0,59 ^{a*}	3,43 \pm 0,30 ^{b*}
Utilización neta de la proteína (UNP)	-	58,71 \pm 7,29 [*]
Relación de eficiencia proteica (REP)	-	2,13 \pm 0,16 [*]

*Los valores son expresados como media \pm SD (desviación estándar) ($n = 4$).

Valores con diferentes letras en la misma fila indican que hay diferencias significativas cuando se somete a una prueba T-student ($p \leq 0,05$).

Tabla 4. Peso animal y consumo de dieta en 14 días de estudio

Peso animal y consumo de alimento	T1	T2
Peso inicial, g	59,00 \pm 9,87 ^a	67,10 \pm 1,44 ^a
Peso final, g	51,63 \pm 7,03 ^a	79,83 \pm 2,90 ^b
Consumo de alimento, g	71,52 \pm 13,11 ^a	70,98 \pm 5,62 ^a

*Los valores son expresados como media \pm SD (desviación estándar) ($n = 4$).

Valores con diferentes letras en la misma fila indican que hay diferencias significativas cuando se somete a una prueba T-student ($p \leq 0,05$).

DISCUSIONES

Formulación de la dieta experimental

El contenido de proteína cruda (14,64 % y 13,47 %) del cacao peruano CCN 51 e ICS 6⁶, ayudó a tomar interés en la calidad de la proteína de este; cacaos de otros países como Ecuador presentan contenidos de proteína cruda de 8,60 % y 8,08 %⁹ valores menores a lo estudiado en esta investigación. Con la mezcla de cacao 10 % de CCN 51 y 90 % de ICS 6 se elaboró un chocolate con formulación óptima⁶ y aceptabilidad sensorial cerca al 70 %, cual motivó a realizar la presente investigación.

La diferencia entre las dietas T1 y T2, se debió a la cantidad de chocolate oscuro CO-70 en la dieta para el modelo animal en estudio, que contribuye en la participación del contenido de teobromina y cafeína del cacao, compuestos alcaloides (contribuyen en el sistema nervioso) que pueden influenciar en la alimentación de las ratas. En publicaciones científicas se encontró dieta para ratas con una participación del 10 % y 19 % de cacao o cocoa en polvo^{10 y 11}, complementadas con caseína como proteína para alcanzar el requerimiento del 10 % de proteína en la dieta, requerido por el modelo animal.

La relación de proteína caseína con respecto a la proteína chocolate oscuro (C/pCh) para la dieta T2 fue de 7,4, lo que significa la presencia importante de la caseína y la combinación de ésta con una proteína de origen vegetal en esta dieta, para el desarrollo de las ratas. Un estudio¹¹ que tuvo como insumo cocoa en polvo y aportó un mayor contenido de proteína del cacao en la dieta del modelo animal, la presencia de caseína fue de 6,23 %¹¹. Sin embargo, la formulación propuesta con chocolate oscuro CO-70 incluye la grasa del cacao (manteca de cacao) y no una grasa vegetal, esto pudo contribuir no solo para el desarrollo sino al mantenimiento de la nutrición del modelo animal.

El contenido de teobromina y cafeína en las dietas es menor en el presente estudio, debido a la presencia del chocolate oscuro CO-70 como insumo (986,98 mg/100g y 167,67 mg/100g

de teobromina y cafeína, respectivamente)⁷. Las dietas diseñadas con cocoa en polvo (1330-1610 mg/100g y 130-180 mg/100g de teobromina y cafeína, respectivamente)¹² tiene una mayor presencia de dichos alcaloides. Las ratas sometidas a la dieta T1 perdieron peso, debido a que el contenido de teobromina y cafeína en el alimento consumido fue de 356,18 mg y 60,51 mg, respectivamente. Sin embargo, las ratas sometidas a la dieta T2, ganaron peso por el menor contenido de teobromina y cafeína en el alimento consumido, 70,05 mg y 11,90 mg de cafeína. Expertos de EFSA¹³ declararon que la dosis letal oral aguda para la rata es de 950 mg/kg de peso corporal. Sólo la dieta T2 se ajustó a un valor de 986,98 mg teobromina/kg de peso de ratas en promedio, motivo por el cual, el grupo de ratas sometidas a la dieta T2 se desarrollaron. El mismo autor declara que los órganos afectados por la toxicidad de teobromina en roedores son el timo y las testes.

Evaluación biológica proteica del chocolate

La digestibilidad aparente (DA) alcanzó valores de 56,82 % y 79,90 %, para la dieta T1 (chocolate 50 %) y la dieta T2 (chocolate 10 %), respectivamente; la harina de arveja chata cocida reportó una DA de 75,09 %¹⁴, mayor a la dieta T1 y menor a la dieta T2. Del mismo modo el pan libre de gluten a base de quinua y almidón de papa presentó un DA de 73,67 %¹⁵ valor superior a la dieta T1 pero menor a la dieta T2.

Valor biológico (VB) alcanzo valores de 75,08 % y 78,32 %, para las dietas T1 y T2, respectivamente; la harina de arveja chata cocida reportó un VB de 69,03 %¹⁴, menor a las dietas T1 y T2. Así mismo el pan libre de gluten a base de quinua y almidón de papa presento un VB de 62,07 %¹⁵, por debajo de ambas dietas T1 y T2.

El balance de nitrógeno (BN) fue positivo, con valores de 0,21 y 0,43, para las dietas T1 y T2, respectivamente. Concordando con lo hallado para grupos de ratas que recibieron dietas a base de harina de galletas elaborada por harina de trigo y galletas con inclusión de: quinua, fibras y su combinación, en donde el BN fue positivo (0,41; 0,44; 0,34 y 0,46)¹⁶. Sin embargo, se aprecia que el BN de la dieta T2 es cercano para el grupo de ratas que consumieron la dieta a base de galletas con inclusión de quinua y la mezcla quinua/fibras, lo cual indica que el chocolate oscuro CO-70 no produjo alteración alguna en el metabolismo de las ratas.

El RPN resultó con valores de 0,80 y 3,43, para las dietas T1 y T2, respectivamente; el polvo de cacao reportó un RPN de 2,03¹¹ valor superior para la dieta T1 e inferior para la dieta T2. La harina de arveja chata cocida reportó un RPN 2,25¹⁴, mayor a la dieta T1 y menor a la dieta T2. Mientras que para el pan libre de gluten a base de quinua y almidón de papa el RPN fue de 2,81 %¹⁵, valor superior a la dieta T1 pero menor a la dieta T2. En tanto que los valores para dietas en ratas Wistar a base de maní y ajonjolí fueron mayores (4,54 y 3,58) respecto a los tratamientos en estudio, debiénd-

dose en parte a su composición nutricional que caracteriza a las leguminosas¹⁷.

Para los indicadores UNP y REP, la calidad de la proteína del chocolate oscuro CO-70 para el grupo que consumió la dieta T2 (chocolate 10 %) incrementó el peso de la rata, cuyos valores de los indicadores fueron 58,71 y 2,13, respectivamente. En cuanto el REP es superior a la harina de arveja chata cuyo valor es de 1,57¹⁴, y a los valores de 1,55 y 1,74 en dietas para ratas Wistar a base de maní y ajonjolí¹⁷; pero menor a los valores de 2,62 y 2,76 para dieta con albumina de huevo y carne de pollo¹⁸, esta superioridad se debe a la fuente proteica de origen animal que como es de conocimiento, es de alta calidad. Mientras que el UNP es inferior al valor de 60 % hallado para un grupo de ratas que consumieron dietas que contenían harina de panes con inclusión de 5-20 % de salvado de arroz¹⁹.

El análisis de ganancia de peso durante los 14 días, la dieta T2 (10 % chocolate CO-70 y 10 % caseína) manifestó en las ratas en desarrollo un incremento de peso en 19%, similar resultado se obtuvo con otra investigación¹¹ que trabajó con alimento similar (cocoa en polvo) bajo una dieta (19,13 % cacao en polvo y 6,23 % de caseína), las ratas en desarrollo incrementaron su peso alcanzando 16,9 %.

Por los resultados obtenidos se sugiere: 1) estudiar las dietas propuestas en el modelo animal y los efectos fisiológicos a nivel de tejidos internos y externos, 2) proponer platos de comida para combinar la proteína del cacao con proteínas de origen animal.

CONCLUSIONES

El estudio mediante bioensayos de dos dietas basadas en chocolate oscuro CO-70 como insumo consideró los parámetros de calidad: digestibilidad aparente (DA), valor biológico (VB), balance de nitrógeno (BN) y razón proteínica neta (RPN). Para la dieta con incremento de pesos durante el desarrollo del modelo animal se evaluaron la utilización neta de la proteína (UNP) y la relación de eficiencia proteica (REP). Los resultados de los indicadores son aceptables para la dieta chocolate oscuro CO-70 en 10 %. Este insumo es una alternativa alimenticia de origen vegetal que puede acompañar a comidas saladas de color pardo, con fuente animal en una relación 7,4 a 1,0.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al bioterio de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) por las facilidades en el uso de las instalaciones.

BIBLIOGRAFIA

1. Gómez-Juaristi M, González-Torres L, Bravo L, Vaquero MP, Bastida S. Efectos beneficiosos del chocolate en la salud cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 2011; 26(2): 289-292. https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112011000200007

2. Ministerio de la producción. Anuario Estadístico. Industrial, Mipyme y comercio interno. Oficina general de evaluación de impacto y estudios económicos. Lima, 2023.
3. Ministerio de desarrollo agrario y riego (MIDAGRI). Observatorio de commodities. Cacao. Boletín trimestral 04-22. Dirección de estudios económicos. Dirección general de políticas agrarias. Lima, 2022.
4. Van den Berg LA, Mes JJ, Mensink M, Wanders A.J. Protein quality of soy and the effect of processing: A quantitative review. *Front. Nutr.* 2022; 9:1004754. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1004754>
5. Acevedo D, Martínez J, Gomes E. Determinación de la calidad nutricional de suero costeño y queso costeño de cabra usando ratas wistar (*Rattus norvegicus*). *Información Tecnológica* 2018; 29(2): 215-224. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642018000200215>
6. Chire-Fajardo GC, Ureña-Peralta MO, García-Torres SM, Hartel RW. Optimization of the dark chocolate formulation from the mixture of cocoa beans and cocoa content by applied surface response method. *Enfoque UTE* 2019; 10(3): 42-54. <https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n3.432>
7. Chire-Fajardo GC, Ureña-Peralta MO. Aspectos de calidad de un chocolate oscuro elaborado con formulación óptima. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria* 2023; 43(2): 75-81. <https://doi.org/10.12873/432chire>
8. NRC – National Research Council. 1995. Nutrient requirements of laboratory animals. 4th edition. Editorial National Academy Press. Washington.
9. Andrade-Almeida J, Rivera-García J, Chire-Fajardo GC, Ureña-Peralta MO. 2019. Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao (*Theobroma cacao* L.) de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE* 2019; 10(4): 1-12. <https://doi.org/10.29019/enfoque.v10n4.462>
10. Camps-Bossacoma M, Massot-Cladera M, Abril-Gil M, Franch A, Pérez-Cano FJ, Castell M. Cocoa diet and antibody immune response in preclinical studies. *Frontiers in nutrition* 4:28. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00028>. PMID: 28702458; PMCID: PMC5484773.
11. Lopes AS, Pezoa-García NH, Amaya-Farfan J. Nutritional quality of cupuassu and cocoa proteins. *Food Science and Technology* 2008; 28(2): 263-268. https://www.researchgate.net/publication/262558312_Nutritional_quality_of_cupuassu_and_cocoa_proteins
12. Durá Esteve S. Estudio del valor nutricional y funcional de cacao en polvo con diferentes grados de alcalinización. Máster en ciencia e ingeniería de alimentos. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. 2016.
13. Alexander J, Benford D, Cockburn A, Cravedi JP, Dogliotti E, Di Domenico A, Fernández-Cruz ML, Fürst P, Fink-Gremmels J, Galli CL, Grandjean P, Gzyl J, Heinemeyer G, Johansson N, Mutti A, Schlatter J, Van Leeuwen R, Van Peteghem C, Verger P. 2008. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. Theobromine as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*: 725, 1-66. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2008.725>
14. Fernández-Montes LF, Sotelo-Méndez A. Calidad nutricional y evaluación biológica de la harina de arveja (*Lathyrus sativus* L.) cocida en ratas. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria* 2023; 43(1): 99-107. <https://doi.org/10.12873/431fernandezmon>
15. García-Ramón F, Alvarez H, Sotelo-Méndez A, Gonzáles Huaman T, Norabuena E, Zarate Sarapura E, Sumarriva Bustinza L. Calidad nutricional, evaluación física, sensorial y biológica en panes convencionales y libres de gluten. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria* 2022; 42(1): 106–114. <https://doi.org/10.12873/421garcia>
16. Sotelo MA, Bernuy-Osorio N, Perez FV, Anticona EP, Ureña M, Vílchez-Perales C. Cookie processed with quinoa flour, tara endosperm and agave leaves fibers: Biological value and global acceptability. *Scientia Agropecuaria* 2019; 10(1): 73–78. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.01.08>
17. Cuj M, Dardón de Richardson J, Mazariegos M, Perez Corrales W, Fischer E, Roman Trigo AV. Determinación de la ganancia de peso, calidad proteica y digestibilidad de ocho dietas a base de dos leguminosas, maní (*Arachis hipogaea* L.) y ajonjolí (*Sesamum indicum* L.) en ratas Wistar. *Revista científica* 2017; 27(1): 21-31. <https://doi.org/10.54495/Rev.Cientifica.v27i1.73>
18. Wadoum REG, Florence FA, Marie KP, Herve M, Fotsouba TV, Colizzi V, Francois ZN. In vivo assessment of protein quality and safety of meat derived from broilers fed diet supplemented with probiotics used as substitute to antibiotics. *Integrative Food Nutrition and Metabolism*, 2019; 6(5): 01-08. <https://doi.org/10.15761/IFNM.1000264>
19. Hegazy AI, Haitham AZ El-khamissi. Nutritional protein quality evaluation of wheat bread supplemented by rice bran flour. *J. Biol. Chem. Environ. Sci.* 2017; 12(4): 321-333. <http://biochemv.blogspot.com/eg/>