

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA
FACULTAD DE INGENIERÍA EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS**



**“DETERMINACIÓN DE CADMIO Y PLOMO EN GRANOS DE CACAO,
FRESCOS, SECOS Y EN LICOR DE CACAO (*Theobroma cacao*)”**

Tesis

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

INGENIERO EN INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

PRESENTADO POR:

DEL AGUILA MELENDEZ, EDWARD ANTHONY

2017

DEDICATORIA

A DIOS:

Por brindarme salud durante todo este tiempo y poder cumplir las metas propuestas.

A MIS PADRES:

A mi mama Flor por su incasable esfuerzo realizado todos estos años y a mi papa Cristobal por a pesar de todo siempre estar apoyándome.

A MI FAMILIA:

A mis tíos y primos que me brindaron su apoyo durante mis años de estudio y en cada momento de dificultad.

A MI NOVIA:

A Jennifer por el apoyo constante para realizar cada objetivo propuesto

AGRADECIMIENTO

A mi alma mater, la Universidad Nacional Agraria de la Selva, y la faculta de Ingeniera en Industrias Alimentarias.

A mi asesor de tesis: Dr. Pedro Pablo Peláez Sánchez por su valiosa contribución en mi formación profesional.

A mis jurados: Ing. Yolanda Ramírez Trujillo, Ing. Jorge Enrique Castro Grasey y al Ing, Lauriano Antonio Zavaleta de la Cruz. Por el interés, motivación, apoyo y criticas necesarias para la realización de este trabajo.

A mis padres por el esfuerzo y el apoyo para lograr este objetivo.

A mi novia Jennifer Muñoz por el apoyo y la motivación para culminar este proyecto.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCION	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Generalidades del cacao	4
2.1.1. Origen del cacao	4
2.1.2. Clasificación Taxonómica	4
2.1.3. Composición química del cacao.....	5
2.1.4. Beneficio del cacao	6
2.1.5. Contaminación de cacao con cadmio y plomo	9
2.2. Generalidades del licor de cacao.....	11
2.2.1. Definición de licor de cacao	11
2.2.2. Tecnología en la elaboración de licor de cacao	12
2.2.3. Composición fisicoquímica.....	13
2.3. Análisis de metales pesados en alimentos	14
2.4. Riesgos de la salud por contaminación con metales pesados.....	15
2.5. Regulaciones internacionales que establecen los límites máximos para el cadmio y plomo en cacao	17
2.6. Consumo anual de chocolate en varios países.....	21
III.MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Lugar de ejecución.....	23
3.2. Material de análisis	24
3.3. Equipos, materiales y reactivos	24

	5
3.3.1. Equipos de laboratorio	24
3.3.2. Materiales.....	25
3.3.3. Reactivos y solventes	26
3.4. Métodos de análisis	26
3.5. Metodología experimental.....	26
3.5.1. Acondicionamiento de la muestra	26
3.5.2. Determinación de humedad en granos frescos, secos y licor de cacao	27
3.5.3. Determinación de cenizas en granos frescos, secos y licor de cacao	27
3.5.4. Determinación de acidez en granos y licor de cacao	28
3.5.5. Determinación de proteínas en granos frescos y secos.....	28
3.5.6. Determinación de grasa en licor de cacao	29
3.5.7. Determinación de metales pesados cadmio y plomo por Espectroscopia de Absorción Atómica de Llama (FAAS)	30
3.6. Diseño experimental	32
IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Caracterización química de los granos frescos.....	35
4.1.1. Porcentaje de humedad en granos frescos.....	35
4.1.2. Contenido de ceniza en granos frescos	37
4.1.3. Porcentaje de acidez en granos frescos	37
4.1.4. Contenido de proteína en granos frescos	38
4.2. Caracterización química de los granos secos	38
4.2.1. Porcentaje de humedad en granos secos.....	40

4.2.2. Contenido de ceniza en granos secos	40
4.2.3. Porcentaje de acidez en granos secos	41
4.2.4. Contenido de proteína en granos secos	41
4.3. Caracterización química del licor de cacao	42
4.3.1. Porcentaje de humedad en licor de cacao	42
4.3.2. Contenido de ceniza en licor de cacao	44
4.3.3. Porcentaje de acidez en licor de cacao.....	44
4.3.4. Porcentaje de grasa en licor de cacao	45
4.4. Contenido de cadmio	45
4.4.1. Contenido de cadmio en granos frescos.....	46
4.4.2. Contenido de cadmio en granos secos	48
4.4.3. Contenido de cadmio en licor de cacao	49
4.5. Contenido de plomo	51
4.5.1. Contenido de plomo en granos frescos.....	52
4.5.2. Contenido de plomo en granos secos.....	53
4.5.3. Determinación de plomo en licor de cacao	54
V. CONCLUSIONES	56
VI. RECOMENDACIONES.....	58
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ABSTRACT	72
ANEXO	74
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Componentes en 100 g de cacao en base seca.	5
2. Especificaciones técnicas para el licor de cacao.	13
3. Características fisicoquímicas del grano y licor de cacao.	13
4. Contenido máximo admisible de metales pesados en productos nutricionales en humanos según la Unión Europea	17
5. Propuestas de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao para observaciones en el trámite 3.	19
6. Nivel máximo admisible en alimentos manteca y polvo de cacao.....	20
7. Consumo de Chocolate en varios países equivalencias en unidades de barras estándar de 70 gramos	21
8. Consumo de Chocolate en América Latina equivalencias en unidades de barras estándar de 70 gramos	23
9. Resultados del análisis químico de los granos frescos de cacao.....	36
10. Resultados del análisis químico de los granos secos de cacao.....	39
11. Resultados del análisis químico de licor de cacao.	43
12. Determinación de la curva estándar de cadmio.	46
13. Resultados del análisis de cadmio en los granos de cacao frescos.....	47
14. Resultados del análisis de cadmio en los granos de cacao secos.	48
15. Resultados del análisis de cadmio en los licor de cacao.	49
16. Determinación de la curva estándar de plomo.	51
17. Resultados del análisis de plomo en los granos de cacao frescos.	53

18. Resultados del análisis de plomo en los granos de cacao secos.....	53
19. Resultados del análisis de plomo en los licor de cacao.	54
A1-1. ANVA del análisis de humedad granos frescos.....	74
A1-2. ANVA del análisis de cenizas granos frescos.....	74
A1-3. ANVA del análisis de acidez granos frescos.....	74
A1-4. ANVA del análisis de proteínas granos frescos.....	75
A1-5. ANVA del análisis de humedad granos secos.....	75
A1-6. ANVA del análisis de ceniza granos secos.....	75
A1-7. ANVA del análisis de acidez granos secos.....	76
A1-8. ANVA del análisis de proteína granos secos.....	76
A1-9. ANVA del análisis de humedad licor de cacao.....	76
A1-10. ANVA del análisis de ceniza licor de cacao.....	77
A1-11. ANVA del análisis de acidez licor de cacao.....	77
A1-12. ANVA del análisis de grasa licor de cacao.....	77
A2-1. ANVA de la determinación de cadmio en granos frescos de cacao.....	78
A2-2. ANVA de la determinación de cadmio en granos secos de cacao.....	78
A2-3. ANVA de la determinación de cadmio en licor de cacao.....	78
A3-1. ANVA de la determinación de plomo en granos frescos de cacao.....	79
A3-2. ANVA de la determinación de plomo en granos secos de cacao.....	79
A3-3. ANVA de la determinación de plomo en licor de cacao.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Determinación de metales pesados en granos de cacao frescos.	33
2. Determinación de metales pesados en muestras comerciales de licor de cacao	34
3. Curva estándar para la cuantificación de cadmio.....	46
4. Curva estándar para la cuantificación de plomo.	52

RESUMEN

La presente investigación permitió determinar el nivel de cadmio y plomo en granos frescos, secos y en licor de cacao (*Theobroma cacao*), planta muy importante en la economía de la Amazonia peruana. Los granos y el licor de cacao se caracterizaron químicamente, se evaluaron los niveles de cadmio y plomo mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama. El análisis estadístico se realizó mediante el diseño DCA, se empleó la prueba de Tukey ($p < 0,05$), se utilizó el software STATGRAPHICS Centurión XVII. La composición química de los granos frescos de cacao fue variada. El grano de Tingo María presentó el mayor porcentaje de acidez (4,16 %), el de San Martín de Pangoa el mayor contenido de humedad (49,45 %) y proteína (14,32 %) y el de Pucallpa el mayor contenido de cenizas (4,36 %). La composición química de los granos secos de cacao fue variada, el grano de la ciudad de San Martín de Pangoa presentó el mayor contenido de humedad (49,45 %) y acidez (1,22 %) y el de Pucallpa el mayor contenido de cenizas (4,65 %) y proteína (14,25 %). La composición química del licor de cacao de Sol de Oro de la COOPAIN presentó el mayor contenido de cenizas (4,28 %) y la marca Oro de ACOPAGRO el mayor contenido de humedad (1,85 %), acidez (1,62 %) y grasa (57,39 %). En granos frescos de Pucallpa se encontraron los niveles más altos de cadmio (0,08 mg/Kg) y en secos (0,11 mg/Kg). En la marca Oro de ACOPAGRO se encontró el nivel más alto de cadmio (0,11 mg/Kg). En los granos frescos de Pucallpa se encontró el mayor nivel de

plomo (9,02 mg/Kg) y San Martín de Pangoa en granos secos (7,62%). En la marca Cacao Peruano de Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa se encontró el nivel más alto de plomo (7,45 mg/Kg).

I. INTRODUCCION

El cacao es un cultivo de mucha importancia en el Perú; en la actualidad existen 144 232 hectáreas cultivadas de cacao, gran parte de las cuales se han instalado gracias a los programas de desarrollo alternativo que promueven la siembra de cacao en la selva peruana. Asimismo, la calidad de las exportaciones de cacao orgánico y convencional ha ido evolucionando, siendo reconocido en eventos internacionales. Sin embargo en los últimos años, la presencia de cadmio y plomo en el cacao y derivados, ha generado preocupación, tanto en los países productores como en los países importadores, así como en los organismos de regulación internacional como la OMS y la FAO.

Los metales pesados presentes en los alimentos tienen múltiples orígenes, en el caso del cacao es probable que la contaminación del producto se dé en las etapas de cultivo, producción y transformación. Estos elementos son eliminados solo parcialmente por el organismo, por lo cual es probable su acumulación y manifestación de sus efectos tóxicos.

Los metales son conocidos como elementos traza debido a que pueden estar presentes en los alimentos en cantidad menor a 50 mg/Kg y aun así pueden provocar problemas tóxicos.

El 16 de septiembre del 2013, la Unión Europea notificó al Comité de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio (OMC) la enmienda al Reglamento Europeo N° 1881/2006, en la cual establecen niveles máximos (NM) de cadmio para el chocolate y productos derivados del

cacao, que entrarán en vigor a partir del 1 de enero del 2019, considerando como contenidos máximos de cadmio en diversos productos de cacao un rango de 0,1 a 0,8 mg/Kg.

En ese sentido, el estudio parte del supuesto: el contenido de cadmio y plomo de granos frescos, secos y licor de cacao se encuentran por encima de los límites establecidos por la norma actual, planteándose los siguientes objetivos:

- Caracterizar químicamente los granos de cacao fresco y seco procedentes de las zonas de Tingo María, San Martín de Pangoa y Pucallpa.
- Caracterizar químicamente el licor de cacao de 3 muestras que se comercializan en la región.
- Determinar el contenido de cadmio y plomo en granos de cacao fresco y seco, procedentes de las zonas de Tingo María, San Martín de Pangoa y Pucallpa.
- Determinar el contenido de cadmio y plomo de 3 muestras de licor de cacao que se comercializan en la región.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cacao

2.1.1. Origen del cacao

El cacao es originario de Centroamérica y de los bosques tropicales de América del Sur (HERNÁNDEZ, 2010), específicamente de las cuencas hidrográficas del alto Amazonas y Orinoco al este de la cordillera de los Andes, en territorios que hoy corresponden a Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Venezuela y las Guayanas (BARTLEY, 2005).

Los frutos son de tamaño y forma muy variable, generalmente de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro. Tiene forma elíptica y son de diferentes colores al madurar (rojo, amarillo, morado y café); tienen entre 20 y 30 semillas que están cubiertas de una pulpa mucilaginosa de color blanco, cuyos cotiledones pueden ser de color blanco y/o violetas (SANDOVAL, 2009).

2.1.2. Clasificación Taxonómica

CONDEZO (2011) indica la siguiente clasificación taxonómica.

Reino	: Plantae
División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Orden	: Malvales
Familia	: Sterculiaceae

Género : *Theobroma*

Especie : *T. cacao*

2.1.3. Composición química del cacao

En el Cuadro 1 se presenta la composición química del cacao.

Cuadro 1. Componentes en 100 g de cacao en base seca.

Bioelemento	Contenido	Bioelemento	Contenido
Calorías	456	Fosforo	537 mg
Agua	3,6 mL	Calcio	106 mg
Proteína	12,0 g	Tiamina	0,17 – 0,24 mg
Grasa	46,3 g	Riboflamina	0,14 – 0,41 mg
Carbohidratos	34,7 g	Niacina	1,7 mg
Fibra	8,6 g	Ácido Ascórbico	3,0 mg
Glucosa	8 – 13 g	Piridina	0,9 mg
Sucrosa	0,4 – 0,9 g	Hierro	3,6 mg

Fuente: NARANJO (2011).

El consumo de productos a base de cacao, principalmente el chocolate, no ha sido considerada como una práctica de estilo de vida saludable por su alto valor calórico; sin embargo, siendo consistentes con las nuevas tendencias del mercado de alimentos, estudios recientes sugieren que el cacao y sus derivados además de tener gran aceptación por los consumidores, presenta múltiples beneficios para la salud debido a que son fuente rica en polifenoles, capaces de modular eventos oxidativos vinculados con aparición de enfermedades cardio y cerebrovasculares (GIL, 2012).

2.1.4. Beneficio del cacao

El beneficio del cacao, se refiere a la preparación de las almendras como paso previo para su comercialización e industrialización. Con este propósito, se ejecutan una serie de operaciones ordenadas que se inicia con la cosecha de las mazorcas en el punto de maduración adecuado para extraer las almendras, seguida por la fermentación concluyendo con el secado del grano. Las almendras fermentadas y secas representan un producto de mejor calidad cuyo transporte y almacenamiento es más fácil (AMORES *et al.*, 2009).

Las características organolépticas pueden ser mejoradas a través de un correcto beneficio, pues este contribuye a generar los procesos fisicoquímicos encargados de originar los compuestos precursores del aroma y el sabor del chocolate, atributos sobresalientes en relación con la materia prima (FEDERACION NACIONAL DE CACAOTEROS, 2004).

Las etapas del beneficio comprenden la quiebra o apertura del fruto, fermentación, secado y almacenamiento. Las cuales se describen a continuación:

- Quiebra y desgrane

Para realizar la quiebra se puede utilizar machetes cortos acondicionados; efectuándose un corte longitudinal con mucho cuidado a fin de no cortar las almendras que permanecen adheridas a la placenta (SANCHEZ, 2007); la quiebra debe realizarse antes de 5 días después de la cosecha y más pronto se haga la separación de los granos es más fácil (ARÉVALO *et al.*, 2004).

El desgrane consiste en extraer los granos separados de la placenta para colocarlos luego a fermentar, generalmente se hace a mano (NAVIA y PASZMIÑO, 2012), verificando que estén libres de placenta o granos de frutos enfermos, cáscaras u otra materia extraña (INDECOPI, 2008).

- **Fermentación**

La fermentación es la etapa más importante dentro del beneficio del cacao (PORTILLO *et al.*, 2006). Durante el proceso los azúcares de la pulpa, debido a los microorganismos (levaduras y bacterias) y reacciones bioquímicas de oxidación forman ácidos que penetran en el cotiledón, produciendo la muerte del embrión, y sucesiva formación de los precursores del aroma del cacao (SANCHEZ, 2007).

Durante la fermentación, se produce ácido acético que se infiltra en los cotiledones y reduce el pH de 6,4 a 4,5 a temperaturas mayores a 45°C, esta acidificación desintegra los compartimientos de la célula y su eventual muerte (ROHSIUS *et al.*, 2006).

El proceso de fermentación incluye importante reacciones enzimáticas que contribuyen a la formación de aminoácidos libres y péptidos a partir de las proteínas, formación de azúcares reductores, hidrólisis de antocianinas y oxidación enzimática de los polifenoles, los cuales son necesarios para producir el sabor y aroma característico del cacao durante el tostado (WOYZECHOWSKY y SANGRONIS, 2006).

La duración de la fermentación se relaciona con la cantidad de pigmentos de color púrpura presentes en los granos frescos y que cuanto más intenso es dicho color más larga debe ser la fermentación (PORTILLO *et al.*,

2005); los cacaos forasteros y trinitarios deben fermentar de 6 a 7 días (RAMOS, 2006).

Por otro lado, los periodos prolongados de fermentación con la idea de lograr porcentajes superiores de almendras fermentadas, puede terminar en sobre fermentación del cacao, generando sabores y olores tipo jamón o podrido, que constituyen defectos graves para la industria. Las cualidades sensoriales del cacao se desarrollan y expresan normalmente con periodos de fermentación y secado que son estandarizados para zonas y tipos de cacao, en base a estudios previos (AMORES *et al.*, 2009).

- **Secado**

El secado tiene por objeto eliminar el exceso de humedad y acidez de las almendras recién fermentadas de aproximadamente el 55 % al 7 %, como garantía para su posterior almacenaje y comercialización (SANCHEZ, 2007).

Es muy importante que la humedad disminuya lentamente, es decir, en un lapso de 5 a 7 días, para favorecer que se completen los cambios químicos (reacciones de oxidación) responsables del sabor y aroma del cacao, de lo contrario se corre el riesgo de inactivar a las enzimas antes de que se haya completado los cambios químicos esenciales, lo cual ocurre por altas temperaturas (>65 °C) y la baja humedad, además un secado rápido induce el aplastamiento de las almendras, dando granos duros y de cutículas arrugada, determinantes para la calidad del producto (NAVIA y PAZMIÑO, 2012).

- **Almacenamiento**

El almacenamiento de los granos secos se debe dar en sacos de yute y en ambientes techados, secos, blancos y de colores claros, bien

ventilados, acomodados y apilados sobre parihuelas de madera, alejado de productos que emanen olores fuertes (ARÉVALO *et al.*, 2004).

Se debe monitorear periódicamente el porcentaje de humedad durante el almacenamiento, con métodos de medición confiable (INDECOPI, 2008).

2.1.5. Contaminación de cacao con cadmio y plomo

El cadmio es un metal pesado (número atómico, 48; masa atómica relativa, 112,41) se produce de forma natural en la corteza terrestre y en el agua del océano. Se emite al medio ambiente como resultado de las dos actividades naturales y antropogénicas. Las fuentes naturales de cadmio incluyen actividad volcánica, la erosión de las rocas que contienen cadmio, la espuma del mar, y la movilización de cadmio depositadas en suelos, sedimentos, vertederos, etc. Las fuentes antropogénicas de cadmio incluyen la extracción y fundición de minerales que contienen zinc, la quema de combustibles fósiles, la incineración de residuos y emisiones procedentes de pilas desechadas o vertederos municipales. (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES & DISEASE REGISTRY, 2008).

En los últimos diez años, los contenidos de plomo de los productos alimenticios se redujeron sensiblemente porque aumentó la sensibilización ante el problema sanitario que puede representar el plomo, por los esfuerzos realizados para reducir la emisión de plomo en su origen y por los progresos en la garantía de calidad de los análisis químicos. El contenido medio de plomo en los productos alimenticios no parece ser causa de alarma pero que debe

proseguirse la acción a largo plazo con el objetivo de continuar reduciendo los contenidos medios de plomo en los productos alimenticios. Por consiguiente, los contenidos máximos deben ser lo más bajos posible (Reglamento (CE) 466/2001 de la Comisión).

Estas fuentes contribuyen a los niveles de cadmio en el suelo y en los sedimentos. El vertido húmedo o seco de cadmio atmosférico en las plantas y en el suelo puede conducir al cadmio a entrar en la cadena alimentaria a través de la absorción foliar o absorción radicular. La tasa de transferencia de cadmio depende de una variedad de factores, incluyendo los índices de depósito, tipo de suelo y la planta, el pH del suelo, contenido de humus, la disponibilidad de la materia orgánica, el tratamiento del suelo con fertilizantes, la meteorología, y la presencia de otros elementos como el zinc (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2000; PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE, 2010).

De acuerdo a la investigación de HUAMANI *et al.* (2012), el tipo de suelo tiene importante influencia en la absorción de cadmio de la planta de cacao. En dicho estudio se realizó un análisis de correlación de Pearson entre el cadmio disponible en el suelo con algunas variables foliares, en el cual se encontró una correlación significativa y positiva ($P < 0,05$) entre el cadmio total en el tejido foliar y el suelo. De manera contraria, la correlación entre el cadmio en el suelo y el contenido de calcio y magnesio fue significativa pero negativa. La absorción de cadmio a nivel de las raíces está en competición directa con otros nutrientes tales como calcio, potasio, magnesio, hierro, cobre, manganeso,

zinc, debido a que pueden ser absorbidos por los mismos portadores de proteínas (BENAVIDES *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ *et al.*, 2008).

Desde hace más de una década, el Instituto de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador se encuentra investigando la presencia de metales pesados en suelos agrícolas, aguas y en cultivos de exportación, particularmente el cacao. Este estudio se realiza con miles de muestras de suelos, tejidos de la planta de cacao y agua. En este sentido, se ha determinado que la secuencia de acumulación de este elemento en los tejidos de cacao se da en el siguiente orden: raíz, tallo, hojas, cáscara o testa y grano de cacao. Esto quiere decir que el grano de cacao contiene el menor porcentaje de cadmio respecto a los demás tejidos de la planta (MITE, 2013). Los niveles de cadmio en granos de cacao, pueden variar considerablemente entre regiones, países y aún entre áreas dentro de un país. El área de menor concentración de cadmio en cacao es el África Occidental; sin embargo, los granos de cacao provenientes de otras regiones, como América del Sur tienen inherentemente mayores niveles de cadmio. Los altos niveles de cadmio en estos países son, probablemente, debido a la presencia del cadmio en el suelo, uso de fertilizantes u otras actividades industriales por ejemplo, extracción minera o contaminación ambiental (CODEX ALIMENTARIUS, 2015).

2.2. Generalidades del licor de cacao

2.2.1. Definición de licor de cacao

El cacao en pasta o licor de cacao es el producto obtenido del cacao sin cáscara ni germen que se obtiene de vainas de cacao de calidad comerciable, que ha sido limpiado y liberado de la cáscara del modo técnicamente más

completo posible, sin quitar ni añadir ninguno de sus elementos constituyentes (CODEX STAN141, 2001).

2.2.2. Tecnología en la elaboración de licor de cacao

La tecnología de licor de cacao es el primer paso para el desarrollo de los derivados de chocolatería, siendo el primer producto que se obtiene del proceso. Para su elaboración pasa por las siguientes operaciones:

Limpieza, es la primera etapa en el procesamiento la cual consiste en eliminar cuerpos extraños y granos defectuosos realizado mediante corrientes de aire (DESROSIER, 1985).

Tostado y/o torrefacción, donde a través de un aire sobrecalentado de 120 a 150 °C por 20 a 40 minutos los granos son tostados con la finalidad de separar la cascarilla del granos así como también reducir la humedad (BRAUDEAU, 1981).

Descascarillado, para terminar de separar los granos de la cascarilla pasa por un tamiz, donde se elimina este material fibroso que hace difícil la molienda y con la finalidad de obtener un chocolate y cocoa de calidad (MONTES, 1985).

Molienda, donde los nibs de cacao son molidos a una temperatura y finura que fluctúan dependiendo de las exigencias para el producto final y se realiza mediante rodillos LIENDO (2005). La pasta obtenida en la molienda en algunos casos puede ser alcalinizada.

Temperado, una vez obtenida la pasta se realiza el temperado con la finalidad de que la manteca cristalice en forma estable a la hora de solidificar DESROSIER (1985).

En el cuadro 2, se muestran las especificaciones técnicas para el licor de cacao.

Cuadro 2. Especificaciones técnicas para el licor de cacao.

Componentes	Cantidad
Humedad	2 % máximo
pH	5 - 6
Grasa	53% mínimo
Fineza (tamiz 200 mesh)	99% mínimo
Ceniza	5 – 6 %
Contenido de cáscara	1,75 % máximo

Fuente: ITINTEC (1981).

2.2.3. Composición fisicoquímica

La composición fisicoquímica de los granos de cacao depende de varios factores entre los que se puede citar: tipo de cacao, origen geográfico, grado de madurez, calidad de fermentación y secado.

En el cuadro 3 se presenta las características fisicoquímicas del grano y licor de cacao.

Cuadro 3. Características fisicoquímicas del grano y licor de cacao.

Variables	Grano	Licor
pH	5,91	5,39
Grasa (%)	48,58	54,24
Cenizas totales (%)	3,27	3,37

Sólidos totales (%)	42,92	46,16
Fibra cruda (%)	4,30	3,67
Proteína (%)	12,25	13,07
Humedad (%)	8,5	1,67

Fuente: Luna *et. al.* (2002).

2.3. Análisis de metales pesados en alimentos

Existen diversas metodologías para la determinación de metales en alimentos, en su mayoría basadas en técnicas electroquímicas y espectroscópicas (POCIECHA y LESTAN, 2009). Dentro de las espectroscópicas las más conocidas son Espectroscopia de Absorción Atómica con Vapor Frío (CVAAS), Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ETAAS), Espectroscopía de Absorción Atómica por Generación de Hidruros (HGAAS), Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama (FAAS), Espectroscopía de Masas Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), Espectroscopía de Emisión Atómica Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES), Espectroscopía de Absorción Atómica con Descomposición Térmica – Amalgamación (TDA-AAS) (CAPAR *et al.*, 2007). Existen también varias opciones para la preparación de la muestra que en muchos casos depende de la matriz y la técnica de medición empleada. Sin embargo para análisis de metales en alimentos son comunes los procesos de digestión húmeda y seca, en algunos casos acelerados por radiación de microondas (CABRERA *et al.*, 1994).

La digestión de la muestra a menudo es un procedimiento lento que tiene problemas asociados de disolución incompleta, precipitación de analitos

insolubles, contaminación y pérdida de elementos volátiles. Una técnica alternativa de la digestión húmeda, es el uso de la radiación de microondas. Mehmet y Durak compararon los métodos de digestión en seco, húmedo y horno microondas en la cuantificación de aluminio, cinc y hierro en yogur por AAS estableciéndose que la digestión de microondas es el mejor método para cuantificar porque registró óptimos resultados, como aluminio 46 mg/kg, cinc 2 mg/kg y hierro de 3,5 mg/kg (MEHMET y DURAK, 2005).

2.4. Riesgos de la salud por contaminación con metales pesados

Algunos metales como cobalto, cromo, hierro, manganeso y cinc son vitales en procesos metabólicos pues hacen parte de metaloenzimas, mientras otros como arsénico, cadmio, mercurio y plomo no tienen efectos beneficiosos y no se conocen mecanismos de homeóstasis en humanos (GEMMA *et al.*, 2008). En los seres humanos, la deficiencia o el exceso de un oligoelemento puede influenciar la absorción, distribución, metabolismo y la eliminación de otros. Por ejemplo la deficiencia de hierro, conocida como anemia hipocrómica, causa un aumento en la absorción de plomo y cadmio en el tracto gastrointestinal (SEBEHAT, 2007).

La absorción de cadmio por las plantas en suelos contaminados y su incorporación a la cadena alimenticia, tiene en la actualidad mucha importancia, debido a que este elemento puede alterar el metabolismo humano compitiendo con el hierro, cobre, cinc, manganeso y selenio por ligantes en los sistemas biológicos (CROWE y MORGAN, 1997). Además el ión cadmio divalente disminuye significativamente la absorción intestinal del hierro en el cuerpo humano (SHUMAN y ELSENHANS, 2002). Cuando se ingiere un alimento

contaminado con cadmio el metal se acumula en los riñones donde su vida media de permanencia es de 18 a 30 años, lo que demuestra la gran dificultad en la eliminación del cadmio por el organismo (CRUCES y MARINT, 1996). Con relación a la presencia de cadmio en cacao, se han reportado concentraciones de 1,8 mg/kg en almendras secas desgrasadas en España (VALENTE, 1995). Otros reportes señalan niveles de 0,07 a 0,36 mg/kg en almendras de cacao de tipo amelonado, trinitario y amazónico provenientes de Nigeria (ONIANWA *et al.*, 1999).

Por su parte el plomo causa problemas en el desarrollo del sistema nervioso central del feto. En recién nacidos, el plomo puede ocasionar daños al cerebro y a los nervios periféricos, que son encargados de enviar información sensorial (tacto, dolor) del cuerpo hacia el sistema nervioso central a través de la médula espinal. En niños la exposición al plomo ha sido asociada con el coeficiente intelectual reducido, desórdenes de aprendizaje, crecimiento lento, comportamiento hiperactivo, antisocial y deterioro del oído. En general el plomo perjudica el riñón, el hígado, el sistema reproductivo además de afectar también procesos básicos de funcionamiento celular y la funcionalidad del cerebro (MOUNIOCU y SZPUNAR, 2003).

Existen reportes sobre la relación entre la presencia de metales pesados, como cadmio y plomo, en alimentos con la salud pública y ambiental. Casos extremos de intoxicación, concentraciones de 20 mg/kg o más de cadmio, tienen como consecuencia daños graves a los órganos internos y alteraciones genéticas (SHUMAN y ELSENHANS, 2002). Estudios poblacionales sobre toxicidad y la acumulación de cadmio sugieren que un considerable número de

individuos presenta niveles tóxicos de cadmio en sus riñones, a pesar de las restricciones sobre niveles mínimos de cadmio permitidos en la ingesta de alimentos. Algunos autores aseguran que si la incorporación de cadmio en la dieta humana continúa aumentando, en los próximos 10 a 20 años se prevé un aumento en los casos de disfunción tubular renal particularmente en grupos de riesgo elevado tales como los diabéticos y personas con bajo consumo de vitamina C (SOISUNGWAN y HASWEL, 2000).

De acuerdo con algunos investigadores, la mayoría de programas de salud pública con relación a la acumulación de cadmio son preventivos debido a carencia de agentes quelantes terapéuticos eficaces que acomplejen y promuevan excreción del cadmio de los riñones (MANN *et al.*, 2002). Por otra parte, para tener una idea más completa sobre el proceso de intoxicación con metales pesados en seres humanos, se ha propuesto el estudio de los complejos de estos metales con moléculas ligantes, como los fitatos, presentes en el cacao y su relación con la biodisponibilidad, absorción y acumulación del metal en el organismo (MOUNICOU y SZPUNAR, 2002).

2.5. Regulaciones internacionales que establecen los límites máximos para el cadmio y plomo en cacao

Los estándares máximos de metales pesados admisibles en productos alimenticios y en especial, en las almendras de cacao, se presentan en la Cuadro 4. Estos niveles pueden variar por países. Hungría es el más exigente.

Cuadro 4. Contenido máximo admisible de metales pesados en productos

nutricionales en humanos según la Unión Europea

Metal Pesado	UE	UE	Codex Alimentarius
	Productos alimenticios ppm	Almendras de cacao ppm	Almendras de cacao ppm
Cadmio (Cd)	1,0	0,50	---
Cobre (Cu)	350,0	50,0	30,0
Níquel (Ni)	40,0	---	---
Plomo (Pb)	5,0	2,00	2,00
Zinc (Zn)	500,0	---	---
Mercurio (Hg)	1,0	0,02	0,02
Cromo (Cr)	45,0	---	---
Selenio (Se)	0,5	---	---

Fuente: Dand (1999)

Muchos aspectos fueron considerados en el Reglamento de la Comisión (UE) N° 488/2014 del 12 de mayo de 2014, tales como:

En algunas regiones de los países productores de cacao, los niveles de cadmio en el suelo pueden ser naturalmente altos, por lo tanto, los datos de ocurrencia en productos de cacao y chocolate proporcionados por países con niveles altos de cadmio en el suelo, deben tomarse en cuenta al establecer los niveles máximos de cadmio.

Al establecer los niveles máximos de cadmio, se deben considerar los datos de ocurrencia para diferentes tipos de chocolates y cacao en polvo vendidos al consumidor final. Puesto que los niveles de cadmio en productos de cacao se relacionan con su contenido de cacao, es conveniente establecer

diferentes niveles máximos de cadmio para productos que contienen diferentes porcentajes de cacao. Esto asegura que los niveles máximos pueden también ser cumplidos por chocolates con un mayor porcentaje de cacao.

La Unión Europea a partir del 1 de enero de 2019 aplicará los siguientes límites de cadmio para productos de cacao y chocolate:

Cuadro 5. Propuestas de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao para observaciones en el trámite 3.

Productos	Nivel máximo de Cadmio mg/Kg
Chocolate con leche, materia seca total de cacao <30%.	0,20
Chocolate, materia seca total de cacao <50%; chocolate con leche, materia seca total de cacao ≥30%.	0,60
Chocolate, materia seca total de cacao ≥50%.	2,0
Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber)	1,5

Fuente: CODEX ALIMENTARIUS, (2015)

Existen diversas normas y regulaciones dependiendo de la región y el mercado, para los niveles permisibles de metales pesados en granos y productos de cacao procesados. Recientemente la Comisión del Código Alimentario (CAC) propuso un valor para el nivel máximo admisible (NMA) de plomo de 0,1 mg/kg en manteca de cacao (un ingrediente clave en el chocolate) y 1,0 mg/kg para masa de cacao y cacao en polvo. La ingesta semanal tolerable propuesta provisionalmente por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de 7 a 25 µg/kg por semana de peso corporal para cadmio y plomo. Sin embargo,

en la India, el contenido de plomo en chocolate es 1.92 mg/kg, casi el doble del NMA en cacao en polvo y manteca de cacao (RANKIN *et al.*, 2005).

Cuadro 6. Nivel máximo admisible en alimentos manteca y polvo de cacao.

Instituciones reguladoras	Concentración de plomo (mg/Kg)	Concentración de cadmio (mg/Kg)
Comisión de Códex alimentario (CAC)	0,2	0,1
Organización Mundial de la Salud (OMS)	0,18-1,200	0,1
American Environmental Safety Institute (AESI)	0,002-0,105	0,002-0,136

Fuente: CAPAR *et al.*, 2007.

Existen estudios relacionados con la determinación de las concentraciones y la biodisponibilidad de cadmio y plomo en cacao y productos afines (la almendra, el licor, la manteca) de diferentes orígenes geográficos. Por ejemplo, se ha establecido que el cacao proveniente de países productores de América del Sur (exceptuando Brasil) contiene más cadmio, en concentraciones superiores a los límites tolerables, que el producido en África y Asia (Costa de Marfil, Ghana, Malasia). Un estudio reciente del American Environmental Safety Institute (AESI) señala que las concentraciones de plomo en los productos de chocolate están entre 0,002 mg/kg y 0,105 mg/kg mientras que las de cadmio oscilan entre 0,002 mg/kg y 0,136 mg/kg, valores por debajo de los legalmente admisibles, en países como Nigeria y Costa de Marfil (CHARLEY y RUSELL, 2006).

Por otra parte los máximos niveles tolerables de cadmio en chocolate y en polvo de cacao en Alemania es 0,4 mg/kg, Finlandia 0,5 mg/kg, Europa Central y Malasia 1.0 mg/kg. Según el Códex Alimentario y la legislación de algunos países europeos los valores permitidos de plomo y cadmio son 2 mg/kg y 0,1 mg/kg, muy por encima de los niveles permitidos por las legislaciones individuales de los países.

2.6. Consumo anual de chocolate en varios países

Suiza, el mayor consumidor de chocolate en Europa, consumió por persona 11,9 kilos en promedio, lo cual equivale a 170 unidades de una barra de 70 g, esto es una barra cada 2 días, aproximadamente. Luego le sigue Irlanda, con un consumo de 9,9 kilos promedio por persona, con una equivalencia de 141 barras de 70 g: aproximadamente una barra cada 3 días. A continuación, el Reino Unido con 9,5 kilos, con una equivalencia de 135 barras de 70 g (NIEBURG, 2012).

Cuadro 7. Consumo de Chocolate en varios países equivalencias en unidades de barras estándar de 70 gramos

País	Consumo anual de chocolate por persona	Equivalente en barras anuales (barra / 70 gr)	Numero de barras al mes
Suiza	11,9	170	14
Irlanda	9,9	141	12
Reino Unido	9,5	136	11
Austria	8,8	126	10
Bélgica	8,3	119	10
Alemania	8,2	117	10
Noruega	8	114	10

Dinamarca	7,5	107	9
Canadá	6,4	91	8
Francia	6,3	90	8
Polonia	6,1	87	7
Rusia	5,9	84	7
Australia	5,9	84	7
Suecia	5,7	81	7
EEUU	5,5	79	7
Holanda	5,4	77	6
Finlandia	5	71	6
Rep. Checa	4,9	70	6
N. Zelanda	4,8	69	6
Ucrania	4,2	60	5
Brasil	2,5	36	3
China	1,2	17	1
India	1,2	17	1

Fuente: Nieburg, (2012).

En América Latina, de acuerdo con la consultora Euromonitor Internacional (Consultora Euromonitor internacional, 2013), el mercado de chocolates en Latinoamérica creció 85 % en los últimos 5 años, sumando ventas por US\$11.400 millones en 2012, siendo Uruguay el país sudamericano de mayor consumo de chocolate, donde cada persona consume anualmente 3,1 kg en promedio. El segundo lugar es para Argentina, donde el consumo per cápita es de 2,4 kg y, el tercer lugar, es Chile, con 2,2 kg. Perú ocupa el puesto 6 en consumo per cápita. En el cuadro 8 se presentan los consumos de chocolate anual en varios países de América Latina con la equivalencia, en unidades, a un producto estándar de 70 g.

Cuadro 8. Consumo de Chocolate en América Latina equivalencias en unidades de barras estándar de 70 gramos

País	Consumo anual de chocolate por persona	Equivalente en barras anuales (barra / 70 gr)	Numero de barras al mes
Uruguay	3,1	44	3,7
Argentina	2,9	41	3,5
Chile	2,2	31	2,6
Brasil	1,7	24	2,0
México	0,7	10	0,8
Perú	0,6	9	0,7
Bolivia	0,6	9	0,7
Costa Rica	0,5	7	0,6
Venezuela	0,4	6	0,5
Ecuador	0,3	4	0,4
Colombia	0,3	4	0,4

Fuente: Consultora Euromonitor international, (2013)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de: Análisis de Alimentos, Análisis de Suelos, Análisis Sensorial, Química y de Nutrición Animal de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, departamento de Huánuco;

a una altitud de 660 m.s.n.m. a 09° 17' 08" de Latitud Sur, a 75° 59' 52" de Latitud este, con clima tropical húmedo y con una humedad relativa media de 84 % y temperatura media anual de 24°C.

3.2. Material de análisis

Los granos de cacao fresco y seco fueron proporcionados por los productores de cacao de la zona de San Martín de Pangoa (Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa), Tingo María (Asociación de Productores Cacao Alto Huallaga) y Pucallpa (Cooperativa Agraria de Cacaoteros Campos Verdes).

El licor de cacao fue adquirido de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa, cuyo nombre comercial es "Chocolate Pangoa", de la Cooperativa Agraria Naranjillo, con nombre comercial "Sol de Oro" y de la ACOPAGRO, de nombre comercial "Oro", en presentación de 90 g.

3.3. Equipos, materiales y reactivos

3.3.1. Equipos de laboratorio

- Mufia.
- Balanza analítica modelo ESJ-210-4 (Digital precisión).
- Estufa modelo ODH6- 9240A (TOMOS Heating Drying Oven).
- Desionizador modelo D 7035 (Barnstead).
- Agitador magnético modelo 625 standard (VWR™ hotplate/stirrer).
- Baño maría modelo YCW-010E (Associated With Cannic, Inc, USA).
- Refrigeradoral cebeam Door Cooling LG GR-5392QLC.
- Espectrofotómetro de absorción atómica de llama modelo spectrAA 55B. (Varian).

- Campana de extracción.
- Plancha calentadora Cimarec⁰² Thermolyne.
- Cocina eléctrica.
- Equipo Soxhlet
- Bureta.
- Destilador.
- Digestor.

3.3.2. Materiales

Materiales de vidrio

- Matraces Erlenmeyer de 100, 125, 150, 200 y 250 ml.
- Vasos de precipitación de 80, 100, 250, 1000 y 2000 ml.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 ml.
- Tubos de ensayo Gene Mate[®] de 50 ml.
- Placas Petri.
- Fiolas de 125, 500 y 1000 ml.
- Probetas graduadas de 25, 100, 250, 500 y 1000ml.

Otros materiales

- Crisol
- Pinzas.
- Espátulas.
- Gradillas.
- Botellas plásticas
- Papel filtro.

3.3.3. Reactivos y solventes

- Ácido clorhídrico concentrado (HCl) Merk.
- Hidróxido de sodio (NaOH) sigma; pureza 99,5 %.
- Ácido nítrico concentrado.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Ácido perclórico concentrado.
- Etanol al 99,99% Merck KGaA.
- Agua destilada.

3.4. Métodos de análisis

- Determinación de humedad (AOAC 13.0001/98).
- Determinación de cenizas (AOAC 13.005/98.).
- Determinación de acidez (AOAC 942.15.2000).
- Determinación de proteínas (AOAC 920.152:2005).
- Determinación de grasa (AOAC 935.60/97).
- Determinación de cadmio, plomo y zinc en almendras de cacao y derivados (AOAC 999.11: 2000).

3.5. Metodología experimental

3.5.1. Acondicionamiento de la muestra

Los granos frescos fueron recolectados en mazorcas de los productores de cacao de la zona de San Martín de Pangoa (Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa), Tingo María (Asociación de Productores Cacao Alto Huallaga) y Pucallpa (Cooperativa Agraria de Cacaoteros Campos Verdes), en cada caso fueron almacenados en una nevera de icopor con hielo seco para

asegurar la integridad de las muestras durante el transporte de las mazorcas al laboratorio. Posteriormente, se extrajeron las almendras, se guardaron en bolsas con cierre hermético, se rotularon y almacenaron en el congelador a - 4°C.

De igual manera se guardaron los granos secos provenientes de las mismas ciudades que los granos frescos y el licor de cacao proveniente de la COOPAIN, ACOPAGRO y Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa.

3.5.2. Determinación de humedad en granos frescos, secos y licor de cacao

Se pesaron 5 gramos de muestra en placas Petri previamente secas y puestas a enfriar en un desecador, que se llevaron a una estufa a 105 °C durante 5 horas. Posteriormente, se pasaron a un desecador y se pesaron nuevamente. Se realizó el procedimiento por triplicado. El porcentaje de humedad se calculó por pérdida de peso de acuerdo con la ecuación 1 (AOAC 13.0001/98):

$$\%Humedad = \frac{\text{peso.muestra.humeda} - \text{peso.muestra.seca}}{\text{peso.muestra.humeda}} * 100 \quad (1)$$

3.5.3. Determinación de cenizas en granos frescos, secos y licor de cacao

El contenido de ceniza está relacionado con la cantidad de minerales en el grano de cacao. Para la determinación de cenizas en productos con alto contenido de grasa (mayor o igual a 40 %) como el licor y la manteca de cacao es necesario proceder con cautela para evitar su auto combustión. Se utilizó el método AOAC 940.26 (AOAC 2005), este análisis consiste en la pérdida por

ignición de todos los componentes orgánicos hasta la obtención de un residuo mineral. Para esto se quemaron los crisoles vacíos, enfría y pesa, luego se pesó en los crisoles 2 gramos de muestras, se incineró en una mufla a una temperatura de 550 °C hasta obtener las cenizas (5 horas), se enfrió en un desecador, luego se pesó. Se realizó el mismo procedimiento para todas las muestras por triplicado. El cálculo de las cenizas se hace de acuerdo con la ecuación 2:

$$\%Ceniza. base. seca = \frac{\text{peso.de.ceniza}}{\text{peso.de.la.muestra}} * 100 \quad (2)$$

3.5.4. Determinación de acidez en granos y licor de cacao

Se pesó 10 g de la granos o licor de cacao y dispersó en 250 ml de agua libre de CO₂ caliente a 80°C, luego se filtró con papel filtro número 40. Se tomó con pipeta volumétrica 25 ml de la dispersión preparada y pasó a un matraz limpio, seco y frío. Se agregó tres gotas de fenolftaleína 1% P/V. Se tituló utilizando hidróxido de sodio 0,1 M hasta obtener un color rosa persistente. Se reportó como mililitros de álcali 0,1 M /100g ó 100 ml de la fruta. Se realizó por triplicado en procedimiento para cada muestra. Para el cálculo de porcentaje de ácido cítrico se hace uso de la ecuación siguiente:

$$Porcentaje\ de\ acidez = \frac{ml\ de\ NaOH\ gastados * M\ NaOH\ real * meq\ acido * 100}{cantidad\ de\ muestra\ (ml) * M\ NaOH\ teorico} \quad (3)$$

3.5.5. Determinación de proteínas en granos frescos y secos

Se secaron los granos y luego se procedió a realizar una molienda

fina. Se pesó 0,1 gramos de muestra, en un cartucho se agregó 0,1 gramos del catalizador de oxidación (mezcla de sulfato de potasio y sulfato de cobre), para acelerar la reacción para convertir el nitrógeno orgánico en iones de amonio, para la digestión, fueron sometidas las muestras con 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado por tres horas; para la destilación, La digestión terminó cuando el contenido del balón mostró transparencia, se agregó 5 mL de hidróxido de sodio al 50% y se colocó en un Erlenmeyer conteniendo 10 mL de ácido bórico más indicadores para recibir el destilado, se conectó al vapor para que se produzca la destilación y se destiló por 5 minutos más después de producido el viraje de color y valoración con ácido clorhídrico para determinar el amoníaco retenido por la muestra. Se realizó el procedimiento por triplicado en cada muestra. Se calculó el contenido de nitrógeno mediante la siguiente ecuación:

$$\%Nitrogeno = \frac{mL\ de\ HCl * Normalidad\ HCl * Miliequivalentes\ de\ N}{Peso\ de\ la\ muestra} * 100 \quad (4)$$

Finalmente se calculó el contenido de proteína a partir de la cantidad de amoníaco producido, utilizando un factor de conversión de nitrógeno a proteína de 6,25 (p).

3.5.6. Determinación de grasa en licor de cacao

Se pesó en un balón limpio, seco y frío, y se registró el peso del balón y el número correspondiente. Se hizo un cartucho con papel filtro, se pesó y se le agregó 3 g de muestra. Se colocó el paquete en el aparato Soxhlet y luego se agregó hexano hasta que una parte del mismo empezó a descender por sifón hacia el balón, y se conectó a una fuente de calor. El solvente hexano empezó a evaporarse al calentarse a 69°C y ascendió a la parte superior de la cámara de

extracción. Allí se condensó por refrigeración con agua y cayó sobre la muestra, y regreso posteriormente al balón por el sifón, arrastrando consigo la grasa. Este ciclo se desarrolló de manera cerrada y la velocidad de goteo del hexano estuvo entre 45 a 60 gotas por minuto. El proceso duró 3 horas. El balón se retiró cuando contenía poco hexano (momento antes que fuera sifonado desde la cámara de extracción). Se evaporó el hexano remanente en el balón en una estufa a 100°C. Se sacó de la estufa y se colocó en un desecador. Luego se pesó el balón, se realizó por triplicado para cada muestra. Luego se calculó el porcentaje de grasa mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Grasa} = \frac{\text{Peso balón con grasa} - \text{Peso balón vacío}}{\text{Gramos de muestra}} * 100 \quad (5)$$

3.5.7. Determinación de metales pesados cadmio y plomo por Espectroscopia de Absorción Atómica de Llama (FAAS)

Previo a la digestión de las muestras, se retiró el mucílago de cacao fresco y luego se secó en estufa a 75 °C durante 5 horas, con las almendras de cacao seco procedentes de los centros de acopio se retiró la cascarilla. Para las muestras de licor de cacao se pasó directamente a la siguiente operación.

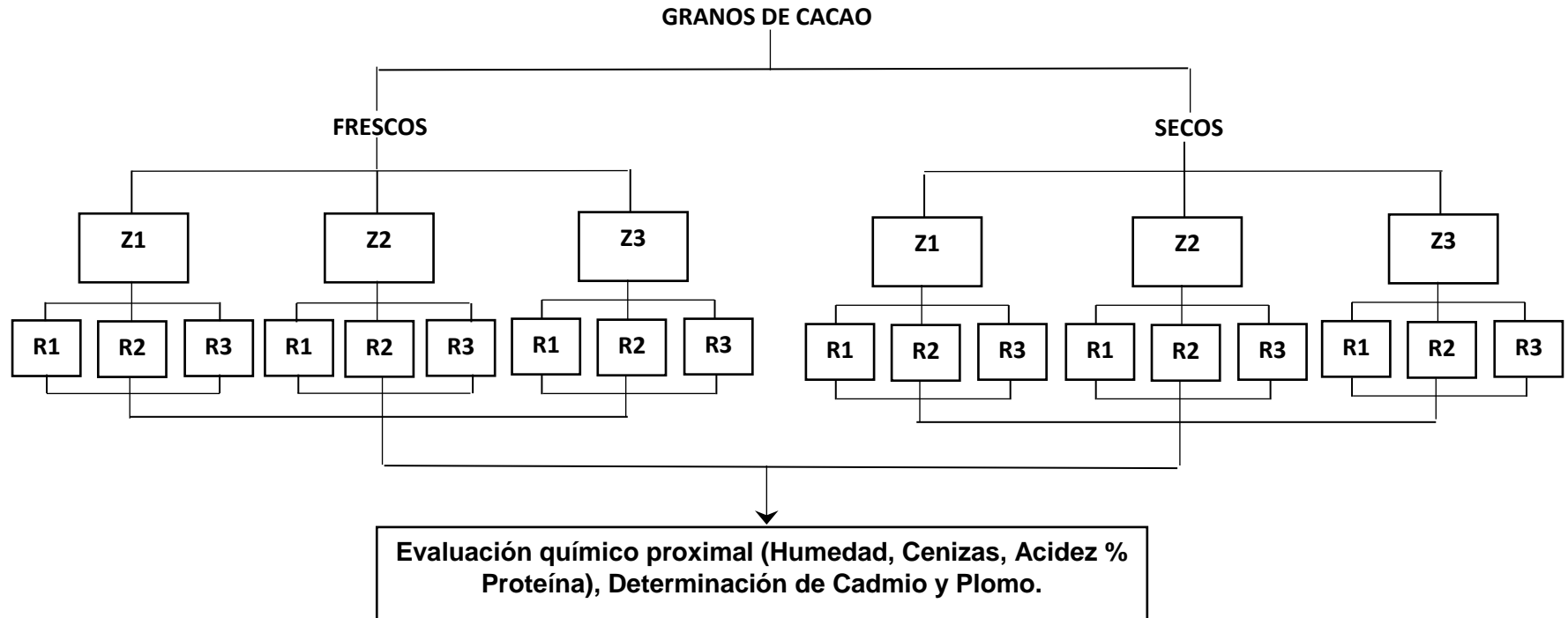
Para la digestión por vía húmeda de las muestras estas fueron trituradas con la ayuda de un mortero cerámico para evitar la contaminación con metales. Se pesaron 2 g de muestra en un matraz de 125 ml, en seguida se agregó una mezcla de HNO₃ (12 ml) + HClO₄ (3 ml), se colocó embudos para ayudar al reflujo y sometió a mineralización nítrico-perclórica. Se colocaron las muestras en una placa calentadora a 180°C por 90 min hasta la digestión total. La digestión se completó cuando empezó a emanar humo blanco y formo un

líquido incoloro. Se filtró los extractos en fioles de 100 ml y fueron llevados a volumen con agua desionizada. Luego se guardó en envases plásticos de 50 mL hasta su posterior lectura. Se realizó el mismo proceso por triplicado para cada muestra (AOAC 999.11: 2000).

La determinación de los metales pesados se realizó utilizando un espectrofotómetro de Absorción Atómica Varian. Como gas de combustión se utilizó una mezcla de Aire-Acetileno a una presión de entrada de 2,5 Pa y un flujo de 1 L/minuto. La absorbancia de las muestras se leyó directamente a una longitud de onda de 228,8 nm para cadmio y 283,3 nm para plomo. A partir del patrón certificado de 1000 mg/L cadmio y plomo respectivamente, se realizaron las curvas de calibración de 1, 2 y 3 ppm para cadmio y de 5, 10 y 15 ppm para plomo se realizaron las mediciones por triplicado.

Finalmente se procedió a leer las muestras preparadas y tomar nota de las absorbancias. Los resultados fueron analizados mediante el diseño completamente al azar (DCA) y en los niveles donde existió significación estadística se aplicó la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

3.6. Diseño experimental

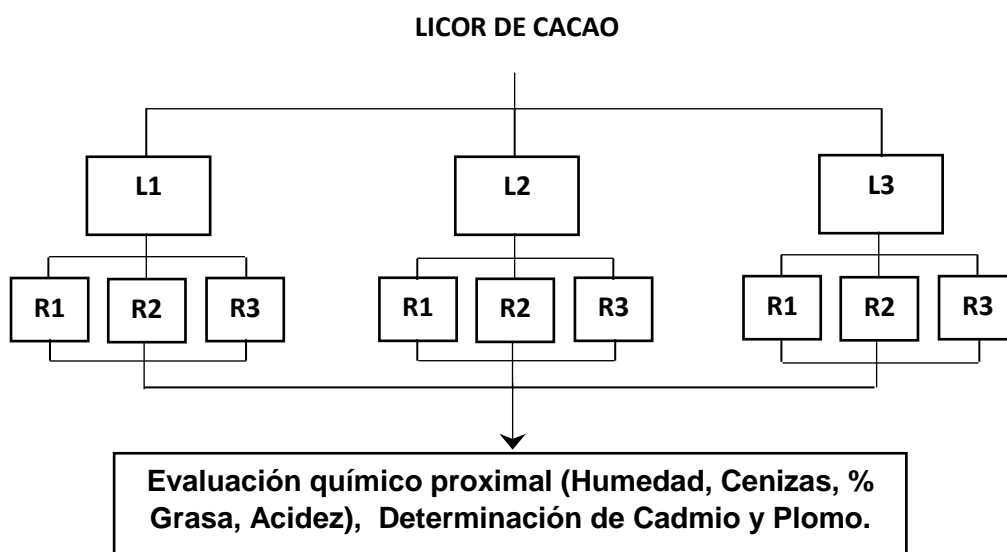


Donde:

Z1= Asociación de Productores Cacao Alto Huallaga, Z2= Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa, Z3=Cooperativa Agraria

Cacaotera Campos Verdes, R1=Repetición 1, R2=Repetición 2, R3= Repetición 3

Figura 1. Diseño experimental de la investigación en granos de cacao.



Donde:

L1= Marca Sol de Oro de la Cooperativa Agraria Naranjillo

L2= Marca Chocolate Pangoa de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa

L3= Marca Oro de la Cooperativa Agraria Cacaotera ACOPAGRO.

R1=Repetición 1, R2=Repetición 2, R3= Repetición 3

Figura 2. Diseño experimental de la investigación en muestras comerciales de licor de cacao

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización química de los granos frescos

Los resultados del análisis químico de los granos frescos de cacao de las tres zonas se presentan en el Cuadro 9, en porcentaje en base húmeda y base seca.

4.1.1. Porcentaje de humedad en granos frescos

El análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-1) entre las zonas de procedencia de los granos de cacao determinó que existe diferencia estadística significativa ($p < 0,05$). Según los resultados, la CAC Pangoa contiene un porcentaje de humedad de $49,45 \pm 0,08$ %, mientras que la CAC Campos Verdes tuvo valores de $48,57 \pm 0,05$ % y la APC Alto Huallaga contiene un porcentaje de humedad de $46,26 \pm 0,03$ %, similar a los resultados de los granos frescos de Tabasco con 46 % de humedad (RODRIGUEZ, 2011), valor que se encuentra a 10 puntos porcentuales por encima de lo reportado por ACOSTA *et al.* (2001). LIENDO *et al.* (1997) reportaron intervalos de humedad para cacaos criollos de 31,6 a 38,4 % al igual que MARTÍNEZ y PALACIO (2010) reportaron intervalos de humedad entre 32,85 a 34,93 % para muestras de cacao fresco de la localidad de Bucaramanga. La diferencia en el contenido de humedad puede deberse a diferentes factores como variedad, madurez del fruto y época de cosecha.

Cuadro 9. Resultados del análisis químico de los granos frescos de cacao.

Determinaciones	Granos frescos de cacao					
	APC Alto Huallaga		CAC Pangoa		CAC Campos Verdes	
	BH ¹	BS ²	BH ¹	BS ²	BH ¹	BS ²
Humedad (%)	46,26±0,03 ^a	-----	49,45±0,08 ^c	-----	48,57±0,05 ^b	-----
Cenizas (%)	2,21±0,02	4,11 ±0,06 ^a	2,11±0,02	4,16±0,02 ^a	2,24±0,02	4,36±0,05 ^b
Acidez (% ácido cítrico)	4,16±0,11 ^b	-----	2,21±0,10 ^a	-----	3,43±0,11 ^a	-----
Proteína (%) (N x 6.25)	6,49±0,06	12,60±0,07 ^a	7,26±0,07	14,32±0,06 ^b	6,72±0,09	12,53±0,11 ^a

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

¹ % Base húmeda, ² % Base seca.

4.1.2. Contenido de ceniza en granos frescos

El análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-2) del porcentaje de cenizas en las zonas de producción, estadísticamente se encontró que existe diferencia significativa entre zonas, el contenido que se encontró en la CAC Campos Verdes fue $4,36 \pm 0,05$ %, seguido por la CAC Pangoa $4,16 \pm 0,02$ % y por ultimo APC Alto Huallaga con $4,11 \pm 0,06$ %, pero en comparación de los granos de cacao de la ciudad de Miranda tuvieron valores entre 2,87 a 3,16 % de cenizas, es inferior a las tres localidades analizadas (ALVAREZ *et al.*, 2010), al igual que NOGALES *et al.*,(2006) han registrado valores de 3,52 a 3,84 % para los granos frescos los cuales son inferiores a los indicados en este estudio, pero si concordantes a los valores obtenidos por PÉREZ *et al.* (2002) y ÁLVAREZ *et al.* (2007) con 3,23 % y 3,29 %, para muestras comerciales de la localidad de Chuao y Cuyagua respectivamente.

4.1.3. Porcentaje de acidez en granos frescos

El análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-3) del porcentaje de la acidez encontró que existe diferencia estadística significativa entre las tres localidades, el mayor contenido se encontró en la APC Alto Huallaga con $4,16 \pm 0,11$ % de ácido cítrico, seguido por el contenido en la CAC Campos Verdes con $3,43 \pm 0,06$ % y por último la CAC Pangoa con $2,21 \pm 0,10$ %, superiores a los granos de la localidad de Aragua en Venezuela que contiene el 1,16 % de ácido cítrico para cacao criollo y 0,95 % para cacao forastero, inferior a las tres localidades (ORTIZ DE BERTORELLI *et al.*, 2009), pero similares porcentaje de acidez frente a los granos de la localidad de Pucacaca con 3,24 % para la localidad de Huingoyacu 3,10 % (CAMACHO, 2014), pues la acidez alta presente

en la testa de los granos de cacao fresco junto con el incremento de la temperatura durante la fermentación conduce a la muerte del embrión y a una lisis parcial de las paredes celulares, ocasionando reacciones que originan los precursores del sabor a chocolate (PORTILLO *et al.*, 2007).

4.1.4. Contenido de proteína en granos frescos

El contenido de proteína de los granos frescos de cacao en diferentes localidades se presenta en el Cuadro 9, realizado el análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-4) se encontró diferencia estadística significativa entre las tres localidades, los granos de la CAC Pangoa presentaron el mayor porcentaje de proteína $14,32 \pm 0,06$ %, seguido por los granos de la APC Alto Huallaga $12,60 \pm 0,07\%$ y por último la CAC Campos Verdes con $12,53 \pm 0,11$ %. ACOSTA *et al* (2001) que reporta $13,81 \pm 0,20\%$ resultados similares para granos de cacao para la localidad de Cumboto, pero inferiores al contenido de proteína en Aragua es el 18,88 %, superior a las tres localidades (ORTIZ DE BERTORELLI, 2009). Las características de los granos cacao fresco mencionadas anteriormente difieren a las reportadas por LIENDO *et al* (1997), quienes al estudiar clones de este tipo de cacao encontraron contenidos de proteínas entre 14,7-20,5 %.

4.2. Caracterización química de los granos secos

Los resultados del análisis químico de los granos secos de cacao de las tres zonas se presentan en el Cuadro 10, en porcentaje en base húmeda y base seca.

Cuadro 10. Resultados del análisis químico de los granos secos de cacao.

Determinaciones	Granos secos de cacao					
	APC Alto Huallaga		CAC Pangoa		CAC Campos Verdes	
	BH ¹	BS ²	BH ¹	BS ²	BH ¹	BS ²
Humedad (%)	7,16±0,02 ^a	-----	7,34±0,07 ^b	-----	7,05±0,08 ^a	-----
Cenizas (%)	3,96±0,07	4,27±0,08 ^b	3,43±0,07	3,71±0,07 ^a	4,32±0,08	4,65±0,08 ^c
Acidez (% ácido acético)	1,02±0,06 ^b	-----	1,22±0,05 ^c	-----	0,86±0,07 ^a	-----
Proteína (%) (N x 6.25)	9,94±0,06	10,70±0,06 ^a	11,92±0,06	12,87±0,06 ^b	13,23±0,03	14,25±0,03 ^c

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística (p<0,05).

¹ % Base húmeda, ² % Base seca.

4.2.1. Porcentaje de humedad en granos secos

Los resultados del porcentaje de humedad que se muestran en el Cuadro 10 y el cálculo del análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-5) muestran que existió diferencia estadística significativa para los granos secos de las tres localidades. Según los resultados la CAC Pangoa contenía un porcentaje de humedad de $7,34 \pm 0,07$ %, mientras que la APC Alto Huallaga tuvo valores de $7,16 \pm 0,02$ % y la CAC Campos Verdes contenía un porcentaje de humedad de $7,05 \pm 0,08$ %; los valores del contenido de humedad fueron similares en todos los factores estudiados, este valor coincidente con el rango (6–8 %) establecido por COVENIN (1998), es un requisito de calidad requerido por los mercados internacionales para la comercialización del grano de cacao. ORTIZ *et al.* (2009) mencionan que paralelamente, durante la eliminación del agua, también puede disminuir la acidez del grano y aumentar el pH, debido a que los ácidos volátiles carboxílicos de cadena corta se volatilizan, reduciéndose el gusto ácido. Con la humedad que presentó el grano, después del secado, se detienen las reacciones de oxidación de los compuestos fenólicos causadas por la enzima polifenoloxidasa. Dicha oxidación favorece la disminución de los niveles de astringencia y del gusto amargo, así como un desarrollo del color café característico del cacao (JINAP *et al.*, 1994). El secado deberá reducir el contenido de humedad hasta niveles que facilite su almacenamiento, transporte, manejo y comercialización (ORTIZ DE BERTORELLI *et al.*, 2009).

4.2.2. Contenido de ceniza en granos secos

Los resultados del contenido de ceniza que se muestran en el Cuadro 10 y el cálculo del análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-6) muestra

que existió diferencia estadística significativa para las tres localidades, encontrándose un mayor porcentaje en la CAC Campos Verdes de $4,65 \pm 0,08$ %, seguido por la APC Alto Huallaga $4,27 \pm 0,08$ % y por último la CAC Pangoa con $3,71 \pm 0,07$ %, MIRANDA (2011) ha registrado valores superiores a las tres localidades de 3,98 a 4,11 %, pero superiores a los valores obtenidos por ÁLVAREZ *et al.* (2007) quienes reportaron resultados entre 2,86 % y 3,32 %, para muestras de la localidad de Cuyagua. PEREA *et al.* (2011) mencionan que el porcentaje de ceniza debe estar entre 3,2 % y 3,9 % para ser considerado cacao fino de primera.

4.2.3. Porcentaje de acidez en granos secos

El análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-7) del porcentaje de la acidez encontró que existe diferencia estadística significativa entre las tres localidades, el mayor contenido se encontró en la CAC Pangoa $1,22 \pm 0,05$ % de ácido acético, seguido por la APC Alto Huallaga con $1,02 \pm 0,06$ % y por último la CAC Campos Verdes con $0,86 \pm 0,07$ %, valores superiores a 0,52 % de las localidades de Miranda, Venezuela (ÁLVAREZ *et al.*, 2010), La disminución de los ácidos volátiles es favorecida cuando el secado se desarrolla lentamente (NOGALES *et al.*, 2006). GARCÍA *et al.* (2007), reportaron que cuando el secado se desarrolla a temperaturas cercanas a 60 °C, el grano retiene altos contenidos de ácido acético, propanoico, isobutírico e isovalérico.

4.2.4. Contenido de proteína en granos secos

Analizando el porcentaje (Anexo - I, Cuadro A1-8) de proteína de granos secos en las diferentes localidades, realizando el análisis de varianza estadísticamente se encontró que existe diferencia significativa entre las

localidades, el mayor contenido se encontró en la CAC Campos Verdes $14,25 \pm 0,03$ %, seguido por la CAC Pangoa con $12,87 \pm 0,06$ % y por último la APC Alto Huallaga con $10,17 \pm 0,06$ %, Belitz Y Grosch, citados por CALDERÓN (2002) menciona que el porcentaje de proteína bruta en granos de cacao seco es de 11,50 %, LARES (2012), reportó valores de $12,21 \pm 0,35$ % de proteína cruda para granos fermentados y secados al sol. Los granos de cacao contienen cerca de 18 % de proteínas (8 % digestibles) (LEUNG, 1980)

4.3. Caracterización química del licor de cacao

Los resultados del análisis químico del licor de cacao de las tres marcas comerciales se presentan en el Cuadro 11 en base húmeda y seca.

4.3.1. Porcentaje de humedad en licor de cacao

Los resultados del porcentaje de humedad y el cálculo del ANVA (Anexo - I, Cuadro A1-9) muestran que existe diferencia estadística significativa para contenido de humedad en licor de cacao comercial. La muestra de la Chocolate Pangoa de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa contiene $1,85 \pm 0,08$ %, mientras que la Oro de ACOPAGRO, $1,52 \pm 0,06$ % y Sol de oro de la COOPAIN $1,30 \pm 0,05$ %; CAMACHO (2014) reportó valores de humedad entre $3,73 \pm 0,19$ % y $3,96 \pm 0,22$ % superiores a los resultados de presente trabajo. Indican un valor máximo de 3 % de humedad para la pasta de cacao, encontrándose valores inferiores en esta investigación (JORDAN, 2013).

Cuadro 11. Resultados del análisis químico de licor de cacao.

Determinaciones	Marcas comerciales					
	Sol de Oro		Chocolate Pangoa		Oro	
	BH ¹	BS ²	BH ¹	BS ²	BH ¹	BS ²
Humedad (%)	1,30±0,05 ^a	-----	1,85±0,08 ^c	-----	1,52±0,06 ^b	-----
Ceniza (%)	3,22±0,03	4,28±0,08 ^c	3,49±0,08	3,55±0,08 ^a	3,92±0,05	3,97±0,05 ^b
Acidez (% ácido oleico)	0,98±0,09 ^a	-----	1,62±0,06 ^b	-----	0,96±0,06 ^a	-----
Grasa (%)	46,93±0,04	47,55±0,05 ^a	56,52±0,06	57,39±0,04 ^c	54,80±0,09	55,83±0,07 ^b

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística (p<0,05).

¹ % Base húmeda, ² % Base seca.

4.3.2. Contenido de ceniza en licor de cacao

El análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-10) del porcentaje de ceniza mostró diferencia estadística significativa entre las marcas comerciales, el mayor contenido se encontró en marca Sol de Oro de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo con $4,28 \pm 0,03$ %, seguido por Oro de la Cooperativa Agraria Cacaotera ACOPAGRO con $3,97 \pm 0,05$ % y por último Chocolate Pangoa de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa con $3,55 \pm 0,08$ %, superiores a los valores reportados por RODRIGUEZ (2009) $3,00 \pm 0,01$ %, GOMEZ (2010), reportó valores entre 3,07 % y 3,29 %. INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN, 2008, indica un valor máximo de 4 % de cenizas para la pasta de cacao, encontrándose valores inferiores en esta investigación.

4.3.3. Porcentaje de acidez en licor de cacao

El análisis de varianza (Anexo - I, Cuadro A1-11) del porcentaje de acidez encontró que existe diferencia estadística significativa entre las tres marcas comerciales, el mayor contenido se encontró en Chocolate Pangoa de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa con $1,62 \pm 0,06$ % de ácido oleico, seguido por el contenido de Oro de la Cooperativa Agraria Cacaotera ACOPAGRO con $1,30 \pm 0,09$ % y por último Sol de Oro de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo con $0,98 \pm 0,09$ %, los cuales son inferiores a la acidez del licor de cacao de Pucaca y Huingoyacu que contiene el $1,93 \pm 0,04$ % y $1,95 \pm 0,04$ % de ácido respectivamente (CAMACHO, 2014). Es necesario mencionar que los cultivos y el manejo postcosecha (beneficio) intervienen de una u otra manera sobre la calidad física, química y organoléptica de las almendras del cacao (AREVALO *et al.*, 2004 y REYES *et al.*, 2004). La Norma Oficial Mexicana

NOM-186-SSA1/SCFI-2002, Indica como máximo 2 gramos de ácido oleico por 100 gramos de licor de cacao.

4.3.4. Porcentaje de grasa en licor de cacao

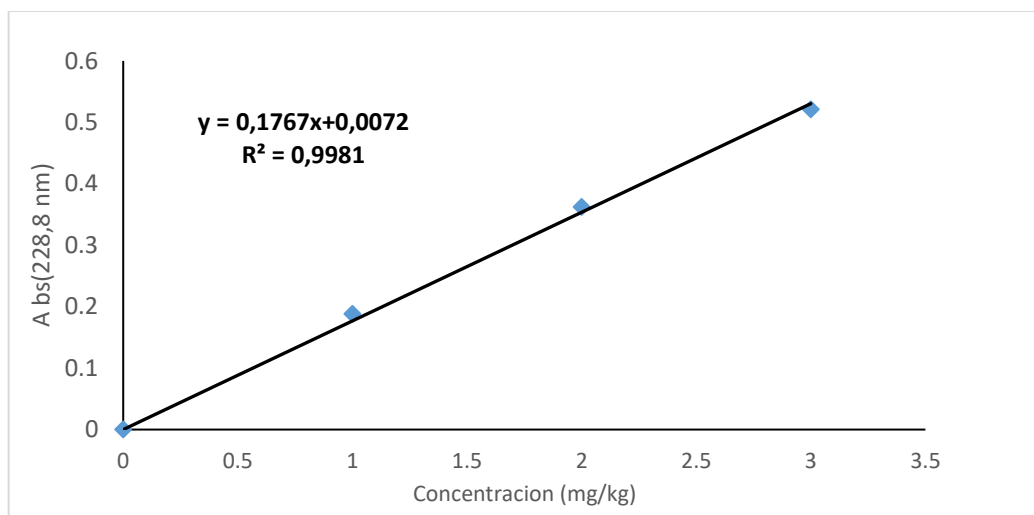
Analizado el porcentaje de grasa en las diferentes marcas de licor de cacao, se encontró que existe diferencia significativa (Anexo - I, Cuadro A1-12) entre las localidades, el mayor contenido se encontró en Chocolate Pangoa de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa $57,39 \pm 0,04$ %, seguido por Oro de la Cooperativa Agraria Cacaotera ACOPAGRO con $55,83 \pm 0,07$ % y por último Sol de oro de la Cooperativa Agraria Industrial Naranjillo con $47,55 \pm 0,05$ %, CAMACHO (2014) indica valores de 52,40 % y 50,65 % similares a los resultados del presente trabajo al igual que PALACIO (2008), quien reportó valores entre 42,71 % y 50,81 %. Por otro lado JORDAN (2013) indica valor mínimo de 48 % y máximo de 54 % de grasa en licores de cacao, siendo este parámetro importante y exigido por la industria chocolatera.

4.4. Contenido de cadmio

Para realizar la cuantificación de cadmio se elaboró una curva estándar en base a patrones de cadmio cuyas concentraciones fueron 1,00; 2,00; 3,00 mg/ml; los resultados se presenta en el Cuadro 12 y Figura 3, en ella se puede apreciar el diagrama de dispersión de las absorbancias, obteniendo una ecuación matemática de dos variables y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9986$.

Cuadro 12. Determinación de la curva estándar de cadmio.

Concentraciones mg Cd/mL	Absorbancia (228,8 nm)			
	R1	R2	R3	Promedio
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
1,00	0,188	0,187	0,189	0,188
2,00	0,361	0,363	0,362	0,362
3,00	0,520	0,523	0,520	0,521

**Figura 3.** Curva estándar para la cuantificación de cadmio.

4.4.1. Contenido de cadmio en granos frescos

Los resultados del contenido de cadmio en granos fresco se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Resultados del análisis de cadmio en los granos de cacao frescos.

Granos frescos	Concentración de cadmio (mg/Kg)
APC Alto Huallaga	0,04±0,01 ^a
CAC Pangoa	0,02±0,01 ^a
CAC Campos Verdes	0,08±0,02 ^b

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

Para el análisis de cadmio se realizó en granos frescos, se trabajó utilizando la curva estándar en base a los patrones de cadmio. Analizando la concentración de cadmio en los granos frescos de cacao de diferentes localidades, estadísticamente se encontró que existe diferencia significativa (Anexo - II, Cuadro A2-1) entre las localidades, dando como resultado el mayor contenido se encontró en la CAC Campos Verdes con $0,08 \pm 0,02$ mg/Kg, seguido por la APC Alto Huallaga con $0,04 \pm 0,01$ estadísticamente igual la CAC Pangoa con $0,02 \pm 0,01$. La concentración de cadmio en granos frescos y fermentados de cacao es menor a los encontrados por ICCO (2011), que evaluado en 82 muestras, las concentraciones variaron desde 0,03 hasta 2,51 mg/Kg y un rango de 0,6 a 0,7 mg/Kg para la zona norte y centro del país. De igual forma en otro estudio realizado en República Dominicana en granos de cacao, muestran niveles de cadmio por debajo de lo propuesto por la Comisión de la Unión Europea (0,3-0,5 mg/Kg), siendo los resultados promedio de 0,24-0,41 mg/kg (DEPARTAMENTO INOCUIDAD AGROALIMENTARIA REPUBLICA DOMINICANA, 2013).

4.4.2. Contenido de cadmio en granos secos

El contenido de cadmio de los granos secos de cacao en diferentes localidades se presenta en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Resultados del análisis de cadmio en los granos de cacao secos.

Granos secos	Concentración de cadmio (mg/Kg)
APC Alto Huallaga	0,06±0,02 ^{ab}
CAC Pangoa	0,05±0,02 ^a
CAC Campos Verdes	0,11±0,02 ^b

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

Realizado el análisis de varianza se encontró diferencia estadística significativa (Anexo - II, Cuadro A2-2) entre las tres localidades, dando como resultado el mayor contenido se encontró en la CAC Campos Verdes $0,11 \pm 0,02$ mg/Kg, seguido por la APC Alto Huallaga con $0,06 \pm 0,02$ estadísticamente igual a la CAC Pangoa con $0,05 \pm 0,02$, que resulta menor a los 2,00 mg/kg de Cadmio reportado por INIAP-PROMSA (2003). EFSA (2011) reporta en Ghana, los niveles de cadmio en “nibs de cacao” fueron en promedio 0,269 mg/kg en el rango de 0,050 y 0,675 mg/kg nibs de cacao dentro del cual se encuentran los resultados obtenidos en el presente trabajo. La evaluación del JECFA, (2013) usó 451 muestras en todo el mundo y mostró que el 26,4 % de las muestras contenían más de 1 mg/kg de cadmio y el 54,3 % de las muestras tenían valores superiores a 0,50 mg/kg de cadmio. Los resultados del presente trabajo muestran niveles de cadmio por debajo de lo propuesto por la Comisión de la Unión Europea (0,3-0,5 mg/Kg) (REGLAMENTO DE LA COMISIÓN (UE) Nro.

488/2014). En Perú se cuenta con la Norma Técnica para los requisitos fisicoquímicos, microbiológicos y técnicos que deben cumplir el cacao y sus derivados. Sin embargo, no menciona exigencias alrededor de metales pesados (Comisión de los Reglamentos Técnicos y Comerciales (INDECOPI, 2007).

4.4.3. Contenido de cadmio en licor de cacao

Los resultados del análisis de cadmio en licor de cacao se presentan en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Resultados del análisis de cadmio en el licor de cacao.

Marcas comerciales	Concentración de cadmio (mg/kg)
Sol de oro	0,10±0,01 ^{ab}
Chocolate Pangoa	0,04±0,01 ^a
Oro	0,11±0,03 ^b

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

Analizando los resultados estadísticamente (Anexo - II, Cuadro A2-3) se encontró que existe diferencia significativa entre las localidades, dando como resultado que el mayor contenido se encontró en la marca Oro ($0,11 \pm 0,03$ mg/Kg, al igual que Sol de oro de la COOPAIN ($0,10 \pm 0,01$) seguido a Chocolate Pangoa de CAC Pangoa ($0,04 \pm 0,01$). En el caso de Ecuador, se llevó a cabo un estudio con 144 muestras de barras de chocolate elaboradas con cacao de diferentes orígenes y comercializadas a nivel mundial para analizar niveles de cadmio en estos. La concentración de sólidos de cacao en estas muestras variaron entre el 40 % al 100 %, con un promedio del 69,59 %, siendo que para

un chocolate con un contenido de materia seca total de cacao $\geq 50\%$ y un rango de 0,03 a 1,56 mg/kg de cadmio y un promedio de 0,38 mg/kg de cadmio y para el caso de un chocolate con un contenido de materia seca total $> 50\%$ y un rango de 0,02 a 0,12 mg/kg de cadmio y un promedio de 0,06 mg/kg similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo (AMORES, 2012). En India, DAHIYA *et al.* (2005), encontraron niveles de cadmio de 0,244 mg/Kg con un rango de 0,010-2,730 mg/Kg para los chocolates a base de cacao. En Pakistán, JALBANI *et al.* (2009), encontraron niveles de cadmio de $0,353 \pm 0,025$ mg/kg para los chocolates a base de cacao. Resultados similares se encontraron en chocolates de Malasia (LEE & LOW, 1985). Según YANUS *et al.* (2004), la concentración de cadmio en chocolate a partir de 4 marcas diferentes comercializadas en Europa, EE.UU. e Israel osciló de 0,065 hasta 0,141 mg/Kg. La Unión Europea a partir del 01 de enero de 2019 aplicará los siguientes límites de cadmio para productos de cacao y chocolate: Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao $\geq 50\%$; 0,80 mg/Kg rango dentro del cual con el manejo actual se cumple la norma (REGLAMENTO DE LA COMISIÓN (UE) Nro. 488/2014). El MERCOSUR (bloque integrado por Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay y Venezuela) definió los límites de la pasta de cacao (0,5mg/Kg) (MERCOSUR/GMC/RES.N°12-20011). En Perú se cuenta con la Norma Técnica para los requisitos fisicoquímicos, microbiológicos y técnicos que deben cumplir el cacao y sus derivados. Sin embargo, no menciona exigencias alrededor de metales pesados (Comisión de los Reglamentos Técnicos y Comerciales (INDECOPI, 2007). De igual manera, la Norma Técnica, que es específica para

Chocolate, no menciona requisitos concretos para metales pesados (Comisión de los Reglamentos Técnicos y Comerciales- INDECOPI, 2008).

4.5. Contenido de plomo

Para realizar la cuantificación de plomo se elaboró una curva estándar en base a patrones de cadmio cuyas concentraciones fueron 1,00; 2,00; 3,00 mg/ml; los resultados se presenta en el Cuadro 16 y Figura 4, en ella se puede apreciar el diagrama de dispersión de las absorbancias, obteniendo una ecuación matemática de dos variables y un coeficiente de determinación $R^2 = 0,9947$.

Cuadro 16. Determinación de la curva estándar de plomo.

Concentraciones mg Cd/mL	Absorbancia (283,3nm)			
	R1	R2	R3	Promedio
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
5,00	0,111	0,110	0,112	0,111
10,00	0,206	0,204	0,208	0,206
15,00	0,285	0,288	0,285	0,286

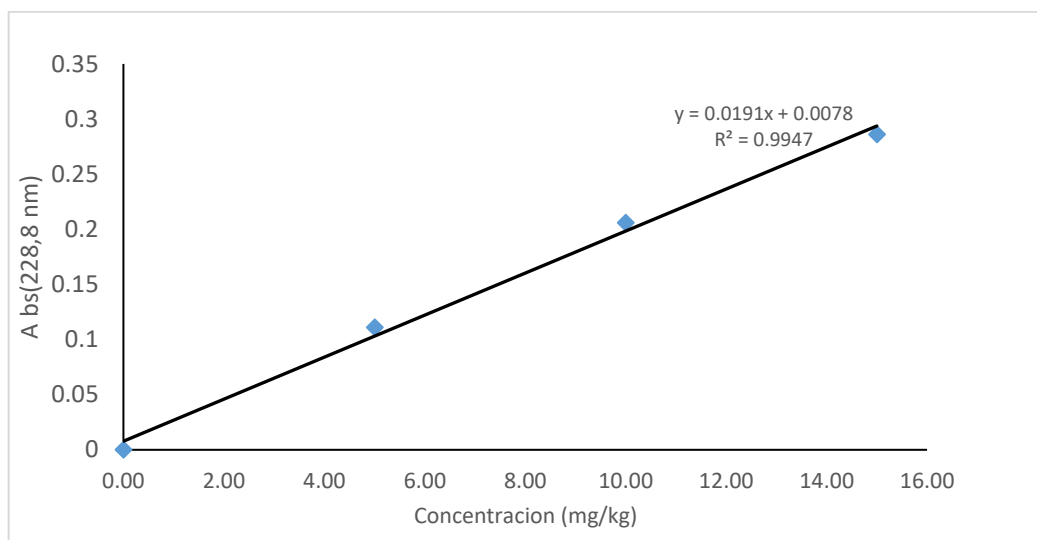


Figura 4. Curva estándar para la cuantificación de plomo.

4.5.1. Contenido de plomo en granos frescos

Analizando la concentración de plomo en los granos frescos de cacao de diferentes localidades, estadísticamente se encontró que existe diferencia significativa (Anexo - III, Cuadro A3-1) entre las localidades, dando como resultado que el mayor contenido se encontró en la CAC Campos Verdes $9,02 \pm 0,52$ mg/Kg, seguido por la APC Alto Huallaga con $6,14 \pm 0,26$, por último la CAC Pangoa con $5,87 \pm 0,52$. RANKIN *et al.* (2005), en Nigeria reportaron resultados en un rango de 0,213 a 1,78 mg/Kg inferiores a los resultados obtenidos en el presenta trabajo; al igual que REYES y MARIA, (2004), reportaron en Santo Domingo resultados entre 0,3 y 2,0 mg/Kg para granos frescos de cacao orgánico. Según la Norma Oficial Mexicana (NOM-186-SSA1/SCFI-2013), los resultados se encuentran por encima de los límites permitidos de 1,0 mg/Kg para granos de cacao, mismo límite máximo mencionado en CODEX ALIMENTARIUS, (2000).

Cuadro 17. Resultados del análisis de plomo en los granos de cacao frescos.

Granos frescos	Concentración de plomo (mg/kg)
APC Alto Huallaga	6,14±0,26 ^a
CAC Pangoa	5,87±0,52 ^a
CAC Alto Huallaga	9,02±0,52 ^b

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

4.5.2. Contenido de plomo en granos secos

El contenido de plomo de los granos secos de cacao en diferentes localidades se presenta en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Resultados del análisis de plomo en los granos de cacao secos.

Granos frescos	Concentración de plomo (mg/kg)
APC Alto Huallaga	6,40±0,52 ^a
CAC Pangoa	7,62±0,30 ^b
CAC Alto Huallaga	5,53±0,30 ^c

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

Realizado el análisis de varianza se encontró diferencia estadística (Anexo - III, Cuadro A3-2) significativa entre las tres localidades, dando como resultado el mayor contenido se encontró en la CAC Pangoa 7,62±0,30 mg/Kg, seguido por la APC Alto Huallaga con 6,40±0,52 mg/Kg por último la CAC Campos Verdes con 5,53 ± 0,30 mg/Kg. REYES y MARIA, (2004), reportaron en

Santo Domingo resultados entre 0,5 y 1,5 mg/Kg para granos secos de cacao orgánico al igual que RANKIN *et al.* (2005), en Nigeria reportaron resultados en un rango de 0,182 a 0,941 mg/Kg inferiores a los resultados obtenidos en el presenta trabajo. Según la Norma Oficial Mexicana (NOM-186-SSA1/SCFI-2013), los resultados se encuentran por encima de los límites permitidos de 1,0 mg/Kg para granos de cacao, mismo límite máximo mencionado en CODEX ALIMENTARIUS, (2000).

4.5.3. Determinación de plomo en licor de cacao

Los resultados de la determinación de plomo en licor de cacao se presentan en el Cuadro 19.

Cuadro 19. Resultados del análisis de plomo en los licor de cacao.

Marcas comerciales	Concentración de plomo (mg/kg)
Sol de oro	6,22±0,60 ^a
Chocolate Pangoa	7,45±0,52 ^b
Oro	6,40±0,52 ^{ab}

Los valores representan (promedio ± SEM, n=3) valores de una misma fila con superíndices distintos, indica diferencia estadística ($p < 0,05$).

Analizada la concentración de cadmio en licor de cacao de las diferentes marcas comerciales, estadísticamente se encontró que existe diferencia significativa (Anexo - III, Cuadro A3-3) entre las localidades, dando como resultado el mayor contenido se encontró en Chocolate Pangoa de CAC PANGO (7,45 ± 0,60 mg/Kg), seguido por Oro de ACOPAGRO (6,40 ± 0,52 mg/Kg), por ultimo Sol de oro de la COOPAIN (6,22 ± 0,60 mg/Kg). Existen reportes que han establecido la presencia plomo y cadmio en 69 diferentes

marcas de chocolates plomo entre 0,049 a 8,04 mg/kg (MOUNICOU y SZPUNAR, 2003; SUDHIR *et al.*, 2005). RANKIN *et al.* (2005), en Nigeria reportó resultados en un rango de 11,9 a 69,8 mg/Kg superiores a los resultados obtenidos en el presenta trabajo. CHARLEY y RUSELL (2006), reportó valores inferiores de entre $0,052 \pm 0,01$ a $0,762 \pm 0,15$.El MERCOSUR (bloque integrado por Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay y Venezuela) definió los límites de la pasta de cacao (0,5mg/Kg) límites que exceden los resultados obtenidos en el presente trabajo (MERCOSUR/GMC/RES.N°12-20011). Según la Norma Oficial Mexicana (NOM-186-SSA1/SCFI-2013), para pasta de cacao, los resultados se encuentran por encima de los límites permitidos de 1,0 mg/Kg para granos de cacao, mismo límite máximo mencionado en CODEX ALIMENTARIUS, (2000). Brasil para chocolate azucarado, no azucarado, manteca de cacao y cacao hay niveles máximos permitidos para plomo que están entre 0,5 y 2 mg/kg (Díaz, 2014). En Perú se cuenta con la Norma Técnica para los requisitos fisicoquímicos, microbiológicos y técnicos que deben cumplir el cacao y sus derivados. Sin embargo, no menciona exigencias alrededor de metales pesados (Comisión de los Reglamentos Técnicos y Comerciales - INDECOPI, 2007). De igual manera, la Norma Técnica, que es específica para Chocolate, no menciona requisitos concretos para metales pesados (Comisión de los Reglamentos Técnicos y Comerciales- INDECOPI, 2008).

V. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se establecieron las siguientes conclusiones:

- Los granos frescos de cacao de la Asociación de Productores Cacao Alto Huallaga presentaron el mayor porcentaje de acidez con 4,16 %, los granos de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa presentaron mayor contenido de humedad (49,45 %) y proteína (14,32 %) y los granos de la Cooperativa Agraria Cacaotera Campos Verdes el mayor contenido de cenizas (4,36 %).
- Los granos secos de cacao de la Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa presentaron mayor contenido de humedad (49,45 %) y acidez (1,22 %) y los granos de cacao de la Cooperativa Agraria Cacaotera Campos Verdes, mayor contenido de cenizas (4,65 %) y proteína (14,25 %).
- El licor de cacao Sol de oro de la cooperativa COOPAIN presentó mayor contenido de ceniza (4,28 %) y el licor de cacao Oro de la cooperativa ACOPAGRO, mayor contenido de humedad (1,85%), acidez (1,62%) y grasa (57,39%).
- En la Cooperativa Agraria Cacaotera Campos Verdes se encontró los niveles más altos de cadmio en granos de cacao fresco (0,08 mg/Kg) y en granos seco (0,11 mg/Kg) los cuales se encuentran dentro de los valores permitidos por el Codex Alimentarius y la Organización Mundial de la Salud (0,5 mg/Kg).

- El licor de cacao de la marca Oro de la ACOPAGRO presentó el nivel más alto de cadmio (0,11 mg/Kg) el cual se encuentra por debajo del límite permitido por el Codex Alimentarius (0,5 mg/Kg).
- El contenido de plomo de granos frescos de cacao de todas las muestras se encuentran por encima del límite establecido por el Codex Alimentarius y la Unión Europea (2,0 mg/Kg), siendo los granos de la Cooperativa Agraria Cacaotera Campos Verdes donde se encontró el mayor de nivel de plomo (9,02 mg/Kg).
- El contenido de plomo de granos secos de cacao de todas las muestras se encuentran por encima del límite establecido por el Codex Alimentarius y la Unión Europea (2,0 mg/Kg), siendo los granos de Cooperativa Agraria Cafetalera Pangoa donde se encontró el mayor de nivel de plomo (7,62 mg/Kg).
- El contenido de plomo en licor de cacao de todas las marcas comerciales se encuentran por encima del límite establecido por el Codex Alimentarius (0,5 mg/Kg) y la Unión Europea (1,0 mg/Kg), siendo la marca Chocolate Pangoa de CAC Pangoa donde se encontró el nivel más alto de plomo (7,45 mg/Kg).

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar la determinación de cadmio y plomo en chocolate de diferentes porcentajes de cacao, polvo de cacao y chocolate para taza.
- Evaluar el contenido de plomo en los suelos de cultivos de cacao de la Asociación de Cacaoteros Alto Huallaga, Cooperativa Agraria Pangoa y Cooperativa Agraria Cacaotera Campos Verdes.
- Realizar la determinación de otros metales pesados en granos de cacao (*Theobroma cacao*) y otros derivados.
- Realizar la determinación de otros metales pesados en granos de cacao (*Theobroma cacao*) frescos y secos en otras ciudades productoras de cacao.
- Evaluar metales pesados en testa y cotiledón en granos frescos; cascarilla y cotiledón, en granos secos.
- Evaluar el contenido de metales pesados en granos secos de cacao (*Theobroma cacao*) en diferentes tipos de clones.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, R., ORTIZ, L., GRAZIANI, L., PARRA, P., TRUJILLO, A. 2001. Estudio de algunas características físicas y químicas de la grasa de los cotiledones de tres tipos de cacao de la localidad de cumboto. *Agronomía Tropical* 51: 119-131
- ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE ALIMENTOS. 2012. M. y T. M. Código Sanitario Argentino, Pub. L. No. Capítulo III.
- ALVAREZ, C., TOVAR, L., GARCÍA, H., MORILLO, F., SÁNCHEZ, P., GIRÓN, C., DE FARIAS, A. 2010. Evaluación de la calidad comercial del grano de cacao (*Theobroma cacao L.*) usando dos tipos de fermentadores. *Revista Científica UDO Agrícola. Miranda.* 10 (1): 76-87.
- ALVAREZ, C., PEREZ, E.; LARES, M. 2007. Caracterización física y química de almendras de cacao fermentadas, secas y tostadas cultivadas en la región de Cuyagua, estado Aragua. *Revista Agronomía tropical* 57(4): 249-256.
- AMORES, F., AGAMA, J., MITE, F., JIMÉNEZ, J., LOOR, G., QUIROZ, J. 2009. EET 544 y EET 558 nuevos clones de cacao nacional para la producción bajo riego en la Península de Santa Elena. Quevedo, Ecuador: INIAP
- AMORES, F. 2012. Cadmio en suelos, almendras de chocolates: implicaciones para exportación del cacao. Quevedo, Ecuador: Los Ríos, Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES & DISEASE REGISTRY. 2008. Chronic Toxicity Profiles. En línea: Department of Health and Human Services (<http://yosemite.epa.gov/r9/sfund/r9sfdocw.nsf/3dc283e6c5d6056f88257>)

[426007417a2/13f59b23032dfedb8825773b0072c385/\\$FILE/App%20B.pdf](http://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285282.pdf), 28 abr 2015).

- AOAC. 2000. Official methods of analysis. En línea: AOAC (<http://img.21food.cn/img/biaozhun/20100108/177/11285282.pdf>, 24 abr 2016)
- AREVALO, E., ZUÑIGA, L., AREVALO, C. 2004. Manejo integrado del cultivo y transferencia de tecnología en la amazonia peruana. Impresiones del castillo S.A. Chiclayo – Perú.
- BARTLEY, B. 2005. The genetic diversity of cacao and its utilization. Wallingford, UK: CABI Publishing. 341 pp.
- BENAVIDES, M., GALLEGO, S., TOMARO, M. 2005. Cadmiun toxicity in plants. Braz. J. Plant. Physiol. 17(1):21 - 34.
- BRAUDEAU, J. 1981. El cacao Colección Agricultura Blume. Barcelona. España. 279 p.
- CAPAR, S., MINDARK, W., CHENG, J. 2007. Analysis of food for toxic elements. Anal. Bioanal Chem. 389, 159–169.
- CABRERA, C., LORENZO, M., GALLEGO, C. 1994. Cadmium contamination levels in seafood determined by electrothermal atomic absorption spectrometry after microwave dissolution. *J. Agric. Food Chem.* 42, 126-128.
- CALDERÓN, L. 2002. Evaluación de los compuestos fenólicos del cacao (*Theobroma cacao L.*) de tipo fino y ordinario de producción nacional durante la fermentación en relación a la calidad. Tesis de Lic. En Química, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito – EC. 114 p.

- CAMACHO, C. 2014. Influencia del porcentaje del clon CCN-51 en las características fisicoquímicas y organolépticas del licor de cacao procedente de Pucaca y Huingoyacu. Tesis Ing. Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 127p.
- CENTRO DE INNOVACIÓN TECNOLOGÍA DEL CACAO. 2011. Contenido de cadmio y plomo en la producción de cacao en San Martín. San Martín. Perú.
- CHARLEY, W., RUSSELL, F. 2006. Lead in cocoa and chocolate: Rankin and Flegal respond. *Environ. Health Perspect.*, 114(5), A 275.
- CODEX STAN 141-1983, Emendada. 2014. Norma para el cacao es pasta y torta de cacao. En línea: www.codexalimentarius.org/input/.../standards/69/CXS_141s_2014.pdf, 28 abr 2015).
- COMISIÓN DE LOS REGLAMENTOS TÉCNICOS Y COMERCIALES-INDECOPI. 2007. Cacao Y Chocolate, Cacao En Polvo (Cocoa) Y Mezclas Secas De Cacao Y Azúcar. Lima, Perú.
- COMISIÓN DE LOS REGLAMENTOS TÉCNICOS Y COMERCIALES-INDECOPI. 2008. Requisitos. Lima, Perú. En línea: (<http://www.mendeley.com/documents/?uuid=d0368683-0b21-476f-8bfd-92abd86fb67b>, 02 feb 2017).
- COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS. 2000. Informe de la 18ª reunión del comité del Codex sobre productos del cacao y el chocolate. En línea: CODEX ALIMENTARIUS (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/005/X8943S/X8943s.pdf>, 21 abr 2015).

- COMISION DEL CODEX ALIMENTARIUS. 2015. Anteproyecto de niveles máximos para el cadmio en el chocolate y productos derivados de cacao. En línea: CODEX ALIMENTARIUS (ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf9/cf09_06s.pdf, 20 abr. 2015).
- COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES. 1998. Norma venezolana N° 50. Granos de cacao. Prueba del Corte (Revisión final). Fondonorma, Caracas. 6 p.
- CONDEZO, O. 2011. Polifenoles totales, antocianinas y actividad antioxidante. (DPPH y peroxilo) en granos de cacao (*Theobroma cacao*) comercial e Tingo María y Tocache. Tesis Ing. Ind. Alimentarias. Tingo María, Perú. Universidad Nacional Agraria de la Selva. 80p.
- CONSULTORA EUROMONITOR INTERNATIONAL. 2013. Fiebres por el chocolate. Summa. Retrieved December 18, 2014, En línea: (<http://www.revistasumma.com/estilo-de-vida/36507->, 02 feb 2017)
- CROWE, A.; MORGAN, E. 1997. Effect of dietary cadmium on iron metabolism in growing rats. *Toxicology. Applied Pharma.* 145, 136–146.
- CRUCES, E.; MARINT, F. 1996. Cadmium binding capacity of cocoa and isolated total dietary fiber under physiological pH conditions. *J. Sci. Food. Agric.* 72, 476-482.
- DAND, R. 1999. *The International Cocoa Trade*. Cambridge: Woohead. 432p.
- DEPARTAMENTO DE INOCUIDAD AGROALIMENTARIA. 2012. Cacao en grano- Monitoreo de residuos de cadmio, Santo Domingo. Ministerio de Agricultura. En línea: Ministerio de Agricultura

(ftp://ftp.fao.org/TC/CPF/Countries/Dominican%20Republic/DOM_CPF_2013-2016.pdf, 15 abr 2015)

- DESROISER, N. 1985. Elementos de tecnología de alimentos. 3 ed. México. CESCA. 783 p.
- DIAZ, A. 2014. Metales pesados. España: Secretaria de Estado de turismo y comercio.
- EFSA. 2011. Statement on tolerable weekly intake for cadmium: Scientific opinion of the EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). The EFSA Journal 9(2):1975.
- FEDERACION NACIONAL DE CACAOTEROS – FONDO NACIONAL DEL CACAO. 2004. El beneficio y características fisicoquímicas del cacao (*Theobroma cacao*). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Colombia. Editorial Produmedios. Pag 8.
- FUNDACION HONDUREÑA DE INVESTIGACIÓN AGRICOLA. 2011. Cacao y agroforesteria informe técnico 2011. Honduras.
- GARCÍA, P; SALGADO, M; BAREL, M; BERTHOMIEU, G; RODRÍGUEZ G; GARCÍA, M. 2007. Moisture, acidity and temperature evolution during cacao drying. Journal of Food Engineering 79: 1159-1165.
- GEMMA, P.; ROSER, M.; DOMINGO, J. 2008. Effects of various cooking processes on the concentrations of arsenic, cadmium, mercury, and lead in foods. *J. Agric. Food Chem.* 56 (23), 11262–11269.
- GIL, J. 2012. Estabilidad y actividad de catequinas presentes en cacaos colombianos durante el proceso de preindustrialización. Facultad Química Farmaceutica. Universidad de Antioquia – Medellin – Colombia. Tesis.

- GOMEZ, O. 2010. Obtención y caracterización del licor de cacao en los clones CCN51, TSH812 y SCC13. Tesis Ing. Químico. Universidad Industrial de Santander Escuela de ingeniería Química. 53p
- HERNÁNDEZ, E. 2010. Tecnología del cacao. Ingeniera de Alimentos. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Colombia-Sogamoso. 170 p.
- HUAMANI, H; HUAUYA. M; MANSILLA L; FLORIDA, N; NEIRA, G. 2012. Presencia de metales pesados en cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) orgánico. Acta Agronomica. Tingo Maria, Perú. 61(4):339-344.
- ICCO. 2011. Heavy Metals in Cocoa International Workshop on possible EU regulations on cadmium in cocoa and chocolate products. En línea: CABI (<http://www.icco.org/sites/sps/documents/Cadmium%20Workshop/CABI.pdf>, 20 abr. 2015).
- INIAP - PROMSA. 2003. Determinación de metales contaminantes en cultivos de exportación y su repercusión sobre la calidad de los mismos. Informe Técnico 2003. Dpto. Suelos. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. 60 p.
- INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. 2008. [En línea]: ICONTEC, (<http://tienda.icontec.org/brief/NTC793.pdf>, documentos, 13 abr. 2015).
- ITINTEC. 1981. Normas técnicas: 208.005, 208.006. Lima Perú. 15(1).
- JALBANI, N., KAZI, T., AFRIDI, H., & ARAIN, B. 2009. Determination of Toxic Metals in Different Brand of Chocolates and Candies, Marketed in Pakistan. Pak. J. Anal. Environ. Chem., 10(1 & 2):48-52.

- JECFA. 2013. Evaluation of certain food additives and contaminants: Seventy-seventh Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No. 983.
- JINAP, S; THIEN, J. 1994. Effect of drying on acidity and volatile fatty acids content of cocoa beans. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65: 67-75.
- JORDAN, R. 2013. Analizar y Validar un Programa de Rehabilitación en la Poscosecha del Cacao CCN51, en la Finca Rami, en la Provincia de Los Ríos. Escuela Superior del Litoral. Guayaquil – Ecuador.
- LAREZ, M.; GUTIERREZ, R.; PEREZ, E.; ALVAREZ, C. 2012. Efecto del tostado sobre las propiedades físicas, fisicoquímicas, composición proximal y perfil de ácidos grasos de la manteca de granos de cacao del estado Miranda, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola* 12 (2): 439-446
- LEE, C., LOW, K., HOH, R. 1985. Determination of Cadmium, Lead, Copper and Arsenic in Raw Cocoa, Semifinished and Finished Chocolate Products. *Pertanika*, 8(2): 243 – 248.
- LEUNG, A.Y. 1980. *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*. John Wiley & Sons. New York.
- LIENDO, R; PADILLA, F; QUINTANA, A. 1997 . Characterization of cocoa butter extracted from Criollo cultivars of *Theobroma cacao* L. *Food research international* 30(9): 727-731.
- LIENDO, R. 2005. Procesamiento del cacao para la fabricación de chocolates y

- subproductos. Tecnología Post cosecha. INIA. Maracay. Food Res. 29: 279-307.
- LUNA, F; CROUZILLAT, D; CIRUO, L; BUCHELLI, P. 2002. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa licor. [En línea]: Journal of Agricultural and Food Chemistry (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12033823>, 10 Jun 2015)
- MANN, S.; RATE, A.; GILKES, R. 2002. Cadmium Accumulation In Agricultural Soils In Western Australia. *Water, Air, Soil Pollut.* 141, 281–297.
- MARTINEZ,R.; PALACIO, C. 2010. Determinación de metales pesados cadmio y plomo en suelos y granos de cacao frescos y fermentados mediante espectroscopía de absorción atómica de llama. Tesis Ing. Química. Bucaramanga, Colombia. Universidad Industrial de Santander. 98p.
- MEHMET, Y.; DURAK, M. 2005. Comparison of dry, wet, and microwave ashing methods for the determination of Al, Zn, and Fe in yogurt samples by atomic absorption spectrometry. *Spectroscopy Letters.* 38, 405–417.
- MERCOSUR. 2011. Reglamento Técnico sobre Límites Máximos de Contaminantes Inorgánicos en Alimentos. [On line]; (www.punto.focal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf , página 6, 15 abr 2015).
- MIRANDA, G. 2011. Evaluación del proceso de secado de granos de cacao Fermentado, en un secador de bandejas con convección Forzada de aire. Tesis, Ing. Químico. Barcelona. Universidad de Oriente Escuela de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. 154p.
- MITE, F. 2013. Situación de cadmio en cacao. Conferencia mundial del cacao. Guayaquil

- MONTES, S. 1985. Bromatología. 2 ed. Buenos Aires. Argentina. Universitaria. Volumen II. 609 p.
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J.; ANDREY, D. 2002. Development of a sequential enzymolysis approach for the evaluation of the bioaccessibility of Cd and Pb from cocoa. *The Royal Society. Chem. Analyst*, 127, 1638–1641.
- MOUNICOU, S.; SZPUNAR, J. 2003. Concentrations and bioavailability of cadmium and lead in cocoa powder and related products. *Food Additive. Contaminants*. 20(4), 343 -356.
- NARANJO, J. 2011. Caracterización de productos tradicionales y no tradicionales derivados de cacao (*Theobroma cacao* L.) en el estado de Tabasco, México. Tesis. Colegio de postgraduados – Institución de Enseñanzas e Investigación de Ciencias Agrícolas. Tabasco – México. 60 p.
- NAVIA, A; PAZMIÑO, N. 2012. Mejoramiento de las Características Sensoriales del Cacao CCN51 a través de la Adición de Enzimas durante el Proceso de Fermentación. Tesis, Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil-Ecuador. 135 p.
- NIEBURG, O. 2012. Interactive Map: Top 20 chocolate consuming nations of 2012. [On line]: <http://www.confectionerynews.com/Markets/Interactive-Map-Top-20-chocolate-consuming-nationsof-2012>. 02 feb 2017.
- NOGALES, J; GRAZIANI, L; ORTIZ-BERTORELLI, L. 2006. Cambios físicos y químicos durante el secado al sol del grano de cacao fermentado en dos diseños de cajones de madera. *Agronomía Tropical* 56: 5–20.

NORMA OFICIAL MEXICANA. 2013. Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba Cacao, chocolate y productos similares, y derivados del cacao. Especificaciones sanitarias. Denominación comercial. Métodos de prueba. En línea: NOM (http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5332832&fecha=17/02/2014, 21 abr 2015).

ONIANWA, I.; DETOLA, C.; IWEGBUE, M. 1999. Trace heavy metals composition of some Nigerian beverages and food drinks. *Food Chem.* 66, 275-279.

ORTIZ DE BERTORELLI, L.; GRAZIANI DE FARIÑAS, Y.; GERVAISE, G. 2009. Evaluación de varios factores sobre características químicas del grano de cacao en fermentación. *Revista Agronomía Tropical* 59(1): 73-79.

PEREA, J.; RAMIREZ, O.; VILLAMIZAR, A. 2011. Caracterización fisicoquímica de materiales regionales de cacao colombiano. *Revista Biotecnología en Sector Agropecuario y Agroindustrial* 9(1): 35-42.

PALACIO, A. 2008. Establecimientos de parámetros (físicos, Químicos y organolépticos) para diferenciar y valorizar el cacao (*theobroma cacao* L.) Producido en dos zonas identificadas al norte y sur del litoral ecuatoriano. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Técnica De Manabi Facultad De Ingeniería Agronomica. 219p.

PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL MEDIO AMBIENTE. 2008. Interim Review of Scientific Information on Cadmium. Geneva: United Nations Environment Program. [En línea]: UNEP

(http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Lead_Cadmium/docs/Interim_reviews/UNEP_GC26_INF_11_Add_2_Final_UNEP_Cadmium_review_and_appendix_Dec_2010.pdf, 21 abr 2015)

- POCIECHA, M.; LESTAN, D. 2009. EDTA leaching of Cu contaminated soil using electrochemical treatment of the washing solution. *J. Hazard. Mater.* 165 (1-3):533-539
- PORTILLO, E; L. GRAZIANI DE FARIÑAS, L; BETANCOURT, E. 2005. Efecto de los tratamientos post-cosecha sobre la temperatura y el índice de fermentación en la calidad del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) *Revista de la Facultad de Agronomía.* 22 (4): 1-11.
- PORTILLO, E; L. GRAZIANI DE FARIÑAS, L; BETANCOURT, E; CROS, E. 2006. Efecto de algunos factores poscosecha sobre la calidad sensorial del cacao criollo porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. *Rev. Fac. Agron. LUZ.* 23: 51-59.
- PORTILLO, E; GRAZIANI DE FARINAS, L; BETANCOURT, E. 2007. Análisis Químico del Cacao Criollo Porcelana (*Theobroma cacao* L.) en el Sur del Lago de Maracaibo. *Revista Facultad Agronomía de LUZ.* 24: 522-546
- RAMOS, G. 2006. Manual del productor de cacao. MPPCT-INIA-FIDES. Caracas.
- RANKIN, C; NRIAGU, J; AGGARWAL, J; AROWOLO, T; ADEBAYO, K; FLEGAL; R. 2005. Lead Contamination in Cocoa and Cocoa Products: Isotopic Evidence of Global Contamination. Nigeria. *Environ Health Perspect* 113(10): 1344–1348.
- REGLAMENTO (CE) No 466/2001 DE LA COMISION. 2001. Por el que se fija

el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. En línea: Comunidades Europeas (http://www.elaw.org/system/files/fcr02_es_0.pdf, 27 abr 2015).

REYES, E; MARIA, A. 2004. Contenido de metales pesados tóxicos (níquel, plomo, cobre, cadmio y manganeso) en el cacao de la provincia Monseñor Novel. En: Cacao. Resultados de Investigación. Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Santo Domingo. p. 62 – 73.

REYES, E; VIVAS, J; ROMERO, A. 2009. La calidad en el cacao. Factores determinantes de la calidad. En línea: CENIAP (<http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd61/calicac.html>, 19 abr.2015)

RODRÍGUEZ-SERRANO, M; MARTÍNEZ-DE LAS CASAS, N; ROMEROPUERTAS, M. C; DEL RÍO, L; SANDALIO, L. 2008. Toxicidad del cadmio en plantas. [En línea]: ECOSISTEMAS: (<http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/409>, 21 abr 2015)

RODRIGUEZ, P.; PEREZ, E.; GUZMAN, R. 2009. Químicas y fisicoquímicas del licor de cacao alcalinizado con: carbonato, bicarbonato e hidróxido de sodio. [En línea]: FAO, (http://www.researchgate.net/...licor_de_cacao.../0912f504cc8f44fc0500000.pdf, documentos, 13 abr. 2015).

RODRIGUEZ. 2011. Estudio de los compuestos volátiles de *Theobroma cacao* L., durante el proceso tradicional de fermentación, secado y tostado. Tesis Dr. Ciencias de Alimentos. México D.F. México. Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 164p

- ROHSIUS, C; MATISSEK, R; LIEBEREI, R. 2006. Free amino acid amounts in raw cocoas from different origins. *Eur. Food Res. Technol.* 222:432–438
- SANCHEZ, V. 2007. Caracterización organoléptica del cacao (*Theobroma cacao* L.), para la selección de árboles con perfil de sabor de comercial. Tesis Ing. Agrónomo. Quevedo, Ecuador. Universidad Técnica estatal de Quevedo. 93 p.
- SANDOVAL, S. 2009. Evaluación de fermentación de cacao (*Theobroma cacao* L.) clon catongo y comparación con dos clones. Tesis. Ing. Agrónomo. Guácimo. Costa Rica. Universidad EARTH. 32 p.
- SEBAHAT, T; POLAT, A; MURAT. 2007. Interaction between anemia and blood levels of iron, zinc, copper, cadmium and lead in children. *Indian J. Pediatrics.* 74:827-830.
- SHUMAN, K.; ELSENHANS, B. 2002. The impact of food contaminants on the bioavailability of trace metals. *Trace Elem. Med. Bio.* 16, 139-144.
- SOISUNGWAN, S.; HASWEL, E.; MOORE, M. 2000. Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects. *British J. Nutrit.* 84, 791-802.
- SUDHIR, D.; RUPALI, K.; HEDGE, R. 2005. Lead, cadmium and nickel in chocolates and candies from suburban areas of Mumbai. India. *J. Food Comp. Analysis.* 52 p.
- VALENTE, C. 1995. Estudio de la composición de la fibra alimentaria de cacao crudo y procesado. *Food. Techn.* 378, 127-132.

- WOYZECHOWSKY, L; SANGRONIS, E. 2006. Efecto del procesamiento del grano del cacao (*Theobroma cacao*) en contenido de polifenoles, taninos y capacidad antioxidante. Universidad Simón Bolívar. 135 p.
- YANUS, R., SELA, H., BOROJOVICH, C., ZAKON, Y., SAPHIER, M., NIKOLSKI, A., GUTFLAIS, E., LORBER, A., KARPAS, Z. 2004. Trace elements in cocoa solids and chocolate: An ICPMS study. *Talanta*, 119:1–4.

ABSTRACT

This research allowed to determine the level of cadmium and lead in fresh, dried beans and cocoa liquor (*Theobroma cacao*), very important in the economy of the Peruvian Amazon plant. Beans and cocoa liquor is chemically characterized, levels of cadmium and lead were evaluated by atomic absorption spectrophotometry Flame. Statistical analysis was performed by DCA design,

Tukey test ($p < 0,05$) was used, the Centurion STATGRAPHICS XVII software was used. The chemical composition of fresh cocoa beans was varied. The grain of Tingo Maria had the highest percentage of acidity (4,16 %), San Martin de Pangoa the higher moisture content (49,45 %) and protein (14,32 %) and the highest content of Pucallpa ash (4,36 %). The chemical composition of dried cocoa beans was varied, the grains of the city of San Martin de Pangoa had the highest moisture content (49,45 %) and acidity (1,22 %) and the largest content Pucallpa ash (4,65 %) and protein (14,25 %). The chemical composition of cocoa liquor Golden Sun COOPAIN had the highest ash content (4,28 %) and the Gold mark ACOPAGRO the higher moisture content (1,85 %), acidity (1,62 %) and fat (57,39 %). Pucallpa fresh beans in the highest levels of cadmium (0,08 mg/Kg) and dried (0,11 mg/kg) was found. In the Gold mark ACOPAGRO the highest cadmium (0,11 mg/kg) level was found. On fresh grains of Pucallpa the largest lead level (9,02 mg/kg) and San Martin de Pangoa in dry beans (7,62 %) was found. Cacao brand in the Peruvian Agrarian Coffee Cooperative Pangoa the highest lead (7,45 mg/kg) level was found.

ANEXO**ANEXO - I****Cuadro A1-1.** ANVA del porcentaje de humedad granos frescos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	16,3061	8,15305	2667,57	0,0000
Error	6	0,0183382	0,00305636		
Total	8	16,3244			

Cuadro A1-2. ANVA del contenido de cenizas granos frescos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,100273	0,0501363	23,22	0,0015
Error	6	0,0129567	0,0529326		
Total	8	0,113229			

Cuadro A1-3. ANVA del porcentaje de acidez granos frescos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	5,83819	2,91909	355,87	0,0112
Error	6	0,0492155	0,00820258		
Total	8	5,88741			

Cuadro A1-4. ANVA del contenido de proteínas granos frescos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	6,18461	3,0923	464,38	0,0000
Error	6	0,0399538	0,00665896		
Total	8	6,22456			

Cuadro A1-5. ANVA del porcentaje de humedad granos secos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,130052	0,0650259	15,02	0,0046
Error	6	0,0259724	0,00432874		
Total	8	0,156024			

Cuadro A1-6. ANVA del contenido de ceniza granos secos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	1,33903	0,669513	108,87	0,0000
Error	6	0,0368992	0,00614987		
Total	8	1,37592			

Cuadro A1-7. ANVA del porcentaje de acidez granos secos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,199712	0,099856	27,16	0,0010
Error	6	0,022056			
Total	8	0,221768			

Cuadro A1-8. ANVA del contenido de proteína granos secos.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	19,1821	9,59106	3405,43	0,0000
Error	6	0,0168984	0,0028164		
Total	8	19,199			

Cuadro A1-9. ANVA del porcentaje de humedad licor de cacao.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,464552	0,232276	60,45	0,0001
Error	6	0,0230541	0,00384235		
Total	8	0,487606			

Cuadro A1-10. ANVA del contenido de ceniza licor de cacao.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,72052	0,36026	104,27	0,0000
Error	6	0,0207296	0,00345493		
Total	8	0,74125			

Cuadro A1-11. ANVA del porcentaje de acidez licor de cacao.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,8456	0,4228	81,31	0,0000
Error	6	0,0312	0,0052		
Total	8	0,8768			

Cuadro A1-11. ANVA del porcentaje de grasa licor de cacao.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	167,76	83,8798	26700,36	0,0000
Error	6	0,0188491	0,00314152		
Total	8	167,778			

ANEXO II

Cuadro A2-1. ANVA del contenido de cadmio en granos frescos de cacao.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,00532508	0,00266254	12,25	0,0076
Error	6	0,00130365	0,000217275		
Total	8	0,00662873			

Cuadro A2-2. ANVA del contenido de cadmio en granos frescos de cacao.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,00533245	0,00266622	5,61	0,0423
Error	6	0,00285035	0,000475059		
Total	8	0,0081828			

Cuadro A2-3. ANVA del contenido de cadmio en licor de cacao.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	0,00860262	0,00430131	16,22	0,0038
Error	6	0,0015909	0,000265149		
Total	8	0,0101935			

ANEXO III

Cuadro A3-1. ANVA del contenido de plomo en granos frescos de cacao.

FV	GL	SC	CM	Fc	Valor P
Tratamiento	2	18,2287	9,11433	44,33	0,0003
Error	6	1,23352	0,205586		
Total	8	19,4622			

Cuadro A3-2. ANVA del contenido de plomo en granos secos de cacao.

FV	GL	SC	CM	FC	VALOR P
TRATAMIENTO	2	6,63968	3,31984	21,80	0,0018
ERROR	6	0,913718	0,152286		
TOTAL	8	7,5534			

Cuadro A3-1 ANVA del contenido de plomo en licor de cacao.

FV	GL	SC	CM	FC	VALOR P
TRATAMIENTO	2	2,61932	1,30966	4,30	0,0694
ERROR	6	1,82744	0,304573		
TOTAL	8	4,44676			

GLOSARIO DE TÉRMINOS

CVAAS, Espectroscopía de Absorción Atómica con Vapor Frío.

ETAAS, Espectroscopía de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica.

FAAS, Espectroscopía de Absorción Atómica de Llama.

FAO, La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

HGAAS, Espectroscopía de Absorción Atómica por Generación de Hidruros.

Hipocrómica, cuando los glóbulos rojos tienen menos color de lo normal al examinarlos bajo un microscopio.

ICP-MS, Espectroscopía de Masas Plasma de Acoplamiento Inductivo.

ICP-AES, Espectroscopía de Emisión Atómica Plasma de Acoplamiento Inductivo.

Metaloenzimas, una proteína que contiene un ion metálico como cofactor.

OMC, Organización Mundial del Comercio.

OMS, Organización Mundial de la Salud.

NM, Niveles máximos.

NMA, Niveles máximos admisibles.

Nibs, Producto obtenido del grano de cacao (*Theobroma cacao*), que ha sido seleccionado, secado, limpiado y los granos son tostado adecuadamente, quebrado y sin cascara.

TDA-AAS, Espectroscopía de Absorción Atómica con Descomposición Térmica –Amalgamación.