

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUIMICA**



**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

**CONTENIDO DE METALES PESADOS EN CACAO DE LA REGIÓN DE  
BARLOVENTO Y CHOCOLATE COMERCIAL VENEZOLANO**

**Presentado por: T.S.U. Jhakelyn Pérez**

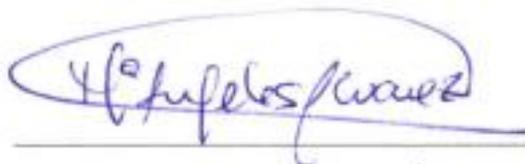
**Tutora:** Prof. María de los Ángeles Álvarez.

Caracas, Mayo 2019.

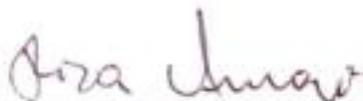
Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela,  
como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado:

**CONTENIDO DE METALES PESADOS EN CACAO DE LA REGIÓN DE  
BARLOVENTO Y CHOCOLATE COMERCIAL VENEZOLANO**

Presentado por la T.S.U. Jhakelyn Esperanza Pérez Vera, certificamos que  
este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de  
Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.



Prof. Maria de los Ángeles Álvarez  
(Tutora)



Prof. Rosa Amaro  
(Jurado)



MSc. Janet Salas  
(Jurado)

## RESUMEN

El contenido de metales pesados en los alimentos se encuentra sometido a regulaciones debido a sus efectos sobre la salud humana. En particular, para los frutos de cacao y chocolate se han impuesto nuevas regulaciones internacionales y nacionales que restringen los niveles de varios elementos, y especialmente el de Cd, para el cual los productos de cacao suramericano presentan niveles superiores a los de origen africano o asiático. Por ello, en este trabajo se determinaron los niveles de metales pesados en chocolates comerciales venezolanos y granos de cacao provenientes de una hacienda del Edo. Miranda, Venezuela, donde una sección de la misma sufre inundaciones periódicas del Rio Tuy.

Los niveles de As, Cd, Cu, Cr, Ni y Pb fueron determinados simultáneamente mediante ET AAS, empleando un programa térmico compromiso con una temperatura de calcinado y de atomización de 600 °C y 2100 °C, respectivamente, y aplicando la técnica cuantitativa de curva de calibración con estándar externo para los granos de cacao y de adición estándar para los chocolates. Los niveles de Zn fueron determinados mediante FAAS, aplicando curva de estándar externo a todas las muestras. La determinación de Ca, Fe, Hg, Mg, Mn, inicialmente considerada, no pudo ser realizada por problemas instrumentales en los equipos de FAAS y CV-AFS que no pudieron resolverse.

Estudios de correlaciones múltiples (PCA) y pruebas paramétricas de contraste (ANOVA) mostraron que la concentración de los elementos en los chocolates está determinada por el contenido de cacao y la denominación de origen (DO), observándose las concentraciones mayores significativamente ( $P \leq 0,05$ ) de Cd en la DO Carenero Superior y de Zn en la de Rio caribe y niveles comparables de Ni en ambas DO. El menor contenido de Cd, Ni y Zn se presentó en la DO Sur del Lago. De manera adicional, se determinó que la manufactura de los chocolates

puede afectar el contenido de los elementos, observándose diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en su concentración entre marcas comerciales.

Por otra parte, se determinaron niveles de Pb superiores a los establecidos en todas las normativas nacionales e internacionales en los chocolates con  $\geq 70$  % de cacao, y específicamente en los correspondientes a la DO Carenero Superior se determinaron niveles de Cd superiores al establecido por la norma UE 488:2014 ( $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y niveles de Cu superiores al límite máximo establecido por la norma nacional COVENIN 52:1999. El contenido de As en todos los chocolates estuvo por debajo del límite de detección.

Los granos de cacao no fermentados descascarillados y secos, presentaron niveles de Cd superiores a los establecidos en la norma COVENIN 50:2018 y el 78% de ellos superó el límite establecido por la UE 488/2014; el 82% de los granos presentaron niveles de Cu superiores a la norma venezolana y el 35% el nivel establecido en el CODEX-STAN 141-1983; y en el caso del Pb, el 91% de las granos superó los límites de la norma venezolana y el 15% el establecido en el CODEX-STAN 141-1983.

Estudios de correlaciones múltiples (PCA) aplicados mostraron que en ambas secciones de la hacienda, la zona inundable y no inundable, la concentración de los elementos crece en dirección hacia el río, lo cual representaría la influencia del Río Tuy sobre el suelo de la hacienda. Sin embargo, los niveles superiores de Cd y Cu se presentan en la zona no inundable. Estudios adicionales mostraron que la concentración de estos elementos aumenta con la acidez determinada en los suelos de la hacienda, la cual es mayor en la zona no inundable. Estos resultados sugieren que el factor determinante en la concentración de Cd y Cu en los frutos de cacao guarda relación con el pH de los suelos y se descarta el efecto de las inundaciones del Río Tuy.

**Palabras Claves:** Cacao, chocolate, denominación de origen, metales pesados, cadmio

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer:

Al Profesor Fernando González y a su familia por permitirnos realizar el muestreo en su hacienda.

A la Facultad de Ciencias por el transporte utilizado durante el muestreo.

Al Centro de Química Analítica por la infraestructura, equipos y reactivos utilizados.

A María A. Álvarez por ser una excelente tutora.

A Ámbar González por ser la mejor compañera de tesis.

Y a todas las personas que contribuyeron a realizar con éxito este trabajo de investigación.

**¡Gracias!**

## INDICE DE CONTENIDO

I	INTRODUCCION .....	1
II	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA .....	4
	2.1 Generalidades .....	4
	2.1.1 Cacao criollo .....	5
	2.1.2 Cacao forastero.....	5
	2.1.3 Cacao trinitario .....	6
	2.2 Procesamiento del cacao .....	7
	2.3 El cacao a nivel mundial .....	9
	2.3.1 Estado legal de metales pesados en cacao .....	10
	2.4 Cacao en Venezuela .....	12
	2.5 Metales pesados en suelos .....	13
	2.6 Contenido de metales pesados en cacao y sus derivados .....	16
	2.6.1 Contenido de metales pesados en granos de cacao .....	17
	2.6.2 Contenido de metales pesados en derivados de cacao .....	19
	2.7 Zona de estudio .....	23
III	OBJETIVOS.....	26
	3.1 Objetivo general.....	26
	3.2 Objetivos específicos.....	26
IV	PARTE EXPERIMENTAL .....	27
	4.1 Equipos.....	27
	4.2 Reactivos.....	28
	4.3 Metodología.....	28
	4.3.1 Muestreo .....	28
	4.3.2 Pre-tratamiento de muestras.....	31
	4.3.3 Tratamiento químico de las muestras .....	32
	4.3.4 Análisis Químico. ....	33
	4.3.5 Técnicas cuantitativas de análisis del contenido metálico.....	34
	4.3.6 Estudio ambiental de las muestras.....	35
V	Resultados y discusion .....	37
	5.1 Optimización de la temperatura de calcinación y atomización por ET AAS.....	37
	5.2 Figuras de mérito de las metodologías analíticas aplicadas.....	40
	5.3 Concentración de metales pesados en chocolates.....	45
	5.4 Concentración de metales en granos de cacao.....	54
VI	CONCLUSIONES .....	65
VII	RECOMENDACIONES .....	67
VIII	REFERENCIAS .....	68
IX	APENDICES .....	74
	Apéndice 1: Figuras de Mérito .....	74
	Apéndice 2: Análisis multivariado en chocolate comercial venezolano.....	78

A.2.1	Análisis de componentes principales en Chocolates con 34 - 73,5 % de cacao .....	78
A.2.2	Análisis de componentes principales en Chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao.....	79
Apéndice 3:	Pruebas de significancia en chocolate entre 58,5 - 61 % de cacao .....	81
Apéndice 4:	Concentración de metales en muestras de granos de cacao.....	82
Apéndice 5:	Análisis multivariado en granos de cacao .....	83
A.5.1	Muestreo Total .....	83
A.5.2	Primer Muestreo.....	84
A.5.3	Segundo Muestreo .....	86
Apéndice 6:	Relación granos de cacao con el pH del suelo .....	88

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Clasificación botánica del árbol de cacao.....	4
<b>Tabla 2.</b>	Clasificación de los granos de cacao de acuerdo a su calidad.....	7
<b>Tabla 3.</b>	Contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. Reglamento de la Unión Europea de la Comisión N° 488/2014, aplicable a partir del 1-01- 2019* .....	10
<b>Tabla 4.</b>	Niveles máximos permitidos por organismos internacionales de metales pesados permitidos en granos de cacao y derivados.....	11
<b>Tabla 5.</b>	Niveles máximos permitidos en Venezuela de metales pesados en granos de cacao y derivados.....	12
<b>Tabla 6.</b>	Regiones y Zonas de Cacao Denominación de Origen en Venezuela.....	13
<b>Tabla 7.</b>	Intervalo de concentraciones geoquímicas normales y anómalas de algunos metales pesados en suelos.....	14
<b>Tabla 8.</b>	Contenido de cadmio en suelos donde se cultiva cacao.....	16
<b>Tabla 9.</b>	Contenido de metales pesados en los granos de cacao de diferente origen geográfico.....	18
<b>Tabla 10.</b>	Contenido de cadmio en cáscaras del grano de cacao.....	19
<b>Tabla 11.</b>	Contenido de cadmio y plomo en polvo de cacao y manteca de cacao.....	20
<b>Tabla 12.</b>	Contenido de metales pesados en chocolate oscuro de diferente origen.....	21
<b>Tabla 13.</b>	Resumen de los estudios realizados en cacao y sus derivados.....	22
<b>Tabla 14.</b>	Contenido de metales en muestras de sedimentos de la cuenca del Río Tuy colectados en el año 1979.....	24
<b>Tabla 15.</b>	Coordenadas de muestreo de las mazorcas de cacao en la hacienda.....	31
<b>Tabla 16.</b>	Especificaciones de las muestras de chocolate comercial.....	31
<b>Tabla 17.</b>	Programa del digestor de microondas optimizado para la digestión total de granos de cacao y chocolate.....	32
<b>Tabla 18.</b>	Programa de temperatura para la determinación simultánea de Cd, Cu, Cr, Ni y Pb.....	33
<b>Tabla 19.</b>	Condiciones Instrumentales empleada para las medidas de ET AAS.....	34
<b>Tabla 20.</b>	Temperaturas de calcinado óptimas en ET AAS.....	39
<b>Tabla 21.</b>	Temperaturas de atomización óptimas en ET AAS.....	39
<b>Tabla 22.</b>	Programa térmico compromiso para la determinación multielemental de Cd, Cu, Cr, Ni y Pb en muestras de granos de cacao y chocolate.....	40

<b>Tabla 23.</b>	Figuras de mérito del análisis por curva de calibración externa.....	41
<b>Tabla 24.</b>	Figuras de mérito del análisis por curva de adición de estándar.....	42
<b>Tabla 25.</b>	Coeficientes de variación del análisis en diferentes tipos de muestras.....	44
<b>Tabla 26.</b>	Concentración de metales pesados en chocolates, en mg kg <sup>-1</sup> .....	46
<b>Tabla 27.</b>	Diferencias significativas (P≤0,05) entre DO de acuerdo a su concentración de elementos en chocolates 58,5 - 61 % de cacao (n=7).....	52
<b>Tabla 28.</b>	Pruebas de contraste de la concentración de metales entre marcas para chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n=7).....	53
<b>Tabla 29.</b>	Concentraciones obtenidas en granos de cacao analizados y reportados en la literatura en mg kg <sup>-1</sup> .....	55
<b>Tabla 30.</b>	Ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas.....	74
<b>Tabla 31.</b>	Figuras de mérito asociadas a la sensibilidad obtenidas en la determinación de metales en chocolate comercial venezolano.....	74
<b>Tabla 32.</b>	Estudio del porcentaje de recuperación en granos de cacao.....	75
<b>Tabla 33.</b>	Estudio del porcentaje de recuperación en chocolate con 73,5% cacao.....	76
<b>Tabla 34.</b>	Estudio del porcentaje de recuperación en chocolate con 61% cacao.....	77
<b>Tabla 35.</b>	Análisis de componentes principales en muestras de chocolates comercial (n= 14).....	78
<b>Tabla 36.</b>	Pesos de los componentes en chocolates (n= 14).....	78
<b>Tabla 37.</b>	Componentes principales en chocolates (n= 14).....	78
<b>Tabla 38.</b>	Correlación ordinal de Spearman en chocolate comercial venezolano (n= 14).....	79
<b>Tabla 39.</b>	Análisis componentes principales en chocolate entre 58,5 - 61 % de cacao (n= 7).....	79
<b>Tabla 40.</b>	Pesos de los componentes en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n= 7).....	79
<b>Tabla 41.</b>	Componentes principales en chocolates entre 58,5-61 % de cacao (n= 7).....	80
<b>Tabla 42.</b>	Correlación ordinal de Spearman en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n= 7).....	80
<b>Tabla 43.</b>	Pruebas de significancia entre denominaciones de origen para chocolate entre 58,5-61 % de cacao (n=7).....	81
<b>Tabla 44.</b>	Pruebas de contraste de la concentración de metales entre marcas para chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n=7).....	81
<b>Tabla 45.</b>	Concentración de metales en granos de cacao en mg kg <sup>-1</sup> .....	82
<b>Tabla 46.</b>	Análisis de componentes principales en granos de cacao, muestreo total(n=34).....	83

<b>Tabla 47.</b>	Pesos de los componentes en granos de cacao, muestreo total (n=34).....	83
<b>Tabla 48.</b>	Componentes principales en granos de cacao, muestreo total (n=34).....	84
<b>Tabla 49.</b>	Correlación ordinal de Spearman en granos de cacao, muestreo total (n=34).....	84
<b>Tabla 50.</b>	Análisis de Componentes Principales en granos de cacao primer muestreo (n=27).....	84
<b>Tabla 51.</b>	Pesos de los Componentes en granos de cacao primer muestreo (n=27).....	85
<b>Tabla 52.</b>	Componentes Principales en granos de cacao primer muestreo (n=27).....	85
<b>Tabla 53.</b>	Correlación Ordinal de Spearman en granos de cacao primer muestreo (n=27).....	86
<b>Tabla 54.</b>	Análisis de Componentes Principales en granos de cacao, segundo muestreo (n=7).....	86
<b>Tabla 55.</b>	Pesos de los Componentes en granos de cacao, segundo muestreo (n=7).....	87
<b>Tabla 56.</b>	Componentes Principales en granos de cacao, segundo muestreo (n=7).....	87
<b>Tabla 57.</b>	Correlación Ordinal de Spearman en granos de cacao, segundo muestreo (n=7).....	87
<b>Tabla 58.</b>	Análisis de Componentes Principales de la relación de granos de cacao con el pH del suelo (n=15).....	88
<b>Tabla 59.</b>	Pesos de los Componentes de la relación de granos de cacao con el pH del suelo (n=15).....	88
<b>Tabla 60.</b>	Componentes Principales de la relación de granos de cacao con el pH del suelo (n=15).....	88
<b>Tabla 61.</b>	Correlación Ordinal de Spearman de la relación de granos de cacao con el pH del suelo (n=15).....	89

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Variedades de cacao (a) criollo, (b) forastero y (c) trinitario.....	5
<b>Figura 2.</b>	Mapa del Estado Miranda, Municipio Acevedo.....	23
<b>Figura 3.</b>	Muestreo de mazorcas de cacao en la hacienda.....	29
<b>Figura 4.</b>	Esquema para la digestión total de las muestras de granos de cacao y chocolate.....	32
<b>Figura 5.</b>	Curvas de calcinado y atomizado para Cd, Cu, Cr, Ni y Pb.....	38
<b>Figura 6.</b>	Contenido de metales pesados en chocolate comercial venezolano de diferentes denominaciones de origen (DO), marcas comerciales, y valores de normativas.....	47
<b>Figura 7.</b>	Bigráfica PCA en chocolate comercial venezolano (n=14).....	49
<b>Figura 8.</b>	Bigráfica del PCA en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n= 7).....	50
<b>Figura 9.</b>	Correlación entre elementos en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n= 7).....	51
<b>Figura 10.</b>	Contenido de metales pesados en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao denominaciones de origen (DO) y marcas comerciales.....	51
<b>Figura 11.</b>	Diagrama de caja y bigotes para metales en granos de cacao.....	56
<b>Figura 12.</b>	Bigráfica del PCA del muestreo de granos de cacao (n=34).....	59
<b>Figura 13.</b>	Correlaciones significativas obtenidas para los elementos en granos de cacao.....	59
<b>Figura 14.</b>	Contenido de metales pesados en las muestras de granos analizados.....	60
<b>Figura 15.</b>	Bigráficas del PCA obtenidos en el primer muestreo (n=27).....	62
<b>Figura 16.</b>	Bigráfica del PCA obtenida en el segundo muestreo (n=7).....	62
<b>Figura 17.</b>	Bigráfica del PCA relación del suelo con los granos de cacao.....	63

## I INTRODUCCION

*Theobroma cacao* es el nombre científico que se le da al árbol del cacao o cacaotero y significa “alimento de los dioses” ya que se deriva de las palabras griegas *theo* y *broma* que significan “dios” y “alimento”, respectivamente (Linnaeus, 1753). Este árbol es nativo de las regiones tropicales húmedas de la parte norte de América del Sur y América Central (De La Cruz et al., 2012)

Los historiadores creen que los Olmecas, una civilización que se desarrolló en México durante el período Preclásico Medio (1500 - 400 a.C), descubrieron que el fruto del cacao era comestible al observar que las ratas lo comían con avidez. Así, se dieron cuenta que el árbol producía una fruta con diversos sabores y con una gran variedad de usos. Se podría decir que ellos fueron los primeros seres humanos en consumir chocolate en forma de bebida, ya que trituraban los granos de cacao y los mezclaban con agua, especias y chiles. Con el tiempo, los Mayas (600 a.C.) y Aztecas (400 d.C.) desarrollaron métodos eficaces para el cultivo de cacao y utilizaban los granos como unidad monetaria. Para estas civilizaciones, el cacao era un símbolo de la abundancia y era común usarlo en rituales religiosos, dedicados a Quetzalcóatl, el dios azteca responsable de traer el árbol del cacao para el hombre, o Chak Ek Chuah, el santo patrón Maya del cacao, y también lo usaban como ofrenda en los funerales de los nobles (De La Cruz et al., 2012).

Hoy en día se conoce que el cacao y el chocolate tienen varios beneficios sobre la salud, principalmente debido a su alto contenido de antioxidantes (flavonoides, catequinas, epicatequinas y polifenoles), que disminuyen el número de radicales libres que ayudan a prevenir enfermedades infecciosas y autoinmunes. Además, reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, cáncer (hepático, gástrico y colon), la diabetes y los niveles de colesterol. También, es recomendado como antidepresivo y para liberar el estrés (Yanus et al., 2014).

La industria farmacéutica extrae del cacao la teobromina y la manteca, la primera para elaborar productos diuréticos y estimulantes del sistema nervioso y la segunda para fabricar productos que ayudan a hidratar la piel y aliviar las quemaduras (Asociación Nacional del Café, 2011)

El cacao tiene una gran importancia en la industria alimenticia, siendo la calidad uno de los aspectos principales que afecta su comercialización en los mercados internacionales (End y Dand, 2015). Por lo general, el grano de cacao es exportado de países en desarrollo como Ghana, Ecuador y Brasil a países como Alemania, Suecia y Estados Unidos para la fabricación de chocolates. Una medida de la calidad del chocolate es el contenido de sólidos de cacao, así el chocolate negro es considerado el de más alta calidad y más saludable (Yanus et al., 2014).

Por otra parte, el cacao y el chocolate pueden contener niveles trazas de metales pesados y su contenido está relacionado con las condiciones del suelo donde fue cultivado. Los elementos presentes en el suelo pueden presentarse de manera natural (proceden de la roca madre, actividad volcánica, o lixiviación de mineralizaciones) o antropogénica (derivan de residuos peligrosos, actividades industriales, minería e industria agrícola, y residuos sólidos urbanos) (Galán y Romero, 2008). Es decir, que la concentración de estos metales puede variar considerablemente entre regiones, países y áreas dentro de un país (Barrueta, 2013).

Entre los metales pesados que son considerados nocivos para la salud se encuentran el cadmio, plomo, cromo, níquel, arsénico y mercurio (Galán y Romero, 2008). El cadmio, puede ocasionar enfermedades renales, pulmonares, digestivas, óseas y cancerígenas (Allen, 2013); el plomo una vez dentro del cuerpo, puede causar anemia, hipertensión, disfunción renal, inmunotoxicidad y toxicidad reproductiva (OMS, 2017); en los niños puede afectar el desarrollo del cerebro y se cree que los efectos neurológicos y conductuales asociados son irreversibles (Martin y Griswold, 2009).

Generalmente, los niños son los más vulnerables a ser contaminados con metales pesados al ingerir alimentos, especialmente al consumir chocolates o bebidas a base de cacao, ya que son uno de sus alimentos preferidos, por lo que la susceptibilidad a efectos adversos es mayor con relación a los adulto (Yanus et al., 2014).

La Unión Europea estableció niveles máximos permitidos de metales pesados en productos alimenticios, por lo que países importadores y exportadores de cacao y sus derivados han mostrado un gran interés en conocer específicamente la concentración de cadmio en este producto ya que su contenido puede traer consecuencias económicas (Barrueta, 2013).

Venezuela es un país productor de cacao de buena calidad, pero de acuerdo a algunos estudios, los niveles de metales pesados que contiene pueden ser elevados, en comparación con los granos de procedencia africana (Bertoldi et al., 2016).

Debido a los riesgos para la salud humana que implican las altas concentraciones de estos elementos en los alimentos y las normativas que rigen la exportación del cacao, el presente trabajo de investigación tiene como finalidad establecer el contenido de metales pesados en granos de cacao provenientes de la hacienda, ubicada en la Región de Barlovento, en la parroquia Panaquire, Edo Miranda y su contenido en chocolate oscuro comercial de manufactura nacional.

## II REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Generalidades

El árbol del cacao posee una altura entre 4 y 8 metros, aunque puede alcanzar los 20 metros si crece libremente bajo la sombra. Su corona es densa y redondeada mientras que su tronco es recto (Asociación Nacional del Café, 2011). Comienza a producir frutos a los 3 o 4 años de haberse plantado y el número de vainas dependerá de la variedad y edad. Alcanza su máxima productividad entre los diez y doce años (De La Cruz et al., 2012). Crece en climas cálidos y húmedos, concentrándose en una franja aproximada de 20 grados al norte y sur de la línea del Ecuador (Gómez et al.,2007).

En la actualidad se han catalogado 22 especies de *Theobroma* pero la única que posee las características apropiadas para ser usada en la preparación del chocolate y la extracción de la manteca de cacao es conocida como *Theobroma cacao* L (Linnaeus, 1753). Su clasificación botánica se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación botánica del árbol de cacao\*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Dilleniidae
<b>Orden</b>	Malvales
<b>Familia</b>	Malvaceae
<b>Subfamilia</b>	Byttnerioideae
<b>Género</b>	<i>Theobroma</i>
<b>Especie</b>	<i>cacao</i> L.

\*Hernández et al.,2017

El cacao es el nombre que se le da a los frutos de éste árbol. Generalmente tienen forma de baya, de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro con un contenido de semillas de 20 a 40 (Linnaeus, 1753). Existen tres variedades del cacao (Figura 1)



**Figura 1.** Variedades de cacao (a) criollo, (b) forastero y (c) trinitario (De La Cruz et al., 2012)

### 2.1.1 Cacao criollo

Es el más antiguo. Es cultivado originalmente en las selvas húmedas de México, América Central y el norte de América del Sur. Corresponde a una planta poco resistente a plagas y enfermedades. Se caracteriza por tener un fruto alargado y puntiagudo con una superficie rugosa de color amarilla. Los granos son grandes y redondos de color blanco y tienen un sabor dulce y aroma delicado (Linnaeus, 1753) Mayormente es cultivado en Ecuador, Venezuela y algunas islas del Pacífico y representa el 5% de la producción mundial (Quintero, 2015)

### 2.1.2 Cacao forastero

Es originario de la Cuenca Amazónica. Corresponde a una planta resistente a enfermedades y plagas (De La Cruz et al., 2012). Su fruto es de forma ovalada y corta con una superficie lisa de color verde. Los granos son aplanados de color morado y de

sabor amargo (Linnaeus, 1753). Proviene, principalmente, de los países del África Occidental, sin embargo, se pueden encontrar en las Guayanas, en la Cuenca del Orinoco, Colombia, Ecuador, Brasil y Perú y representa el 80% de la producción mundial (Quintero, 2015).

### 2.1.3 Cacao trinitario

Es originario de Trinidad y es un híbrido natural de las variedades anteriores, de frutos con formas y colores diversos y semillas grandes. Tiene adecuado aroma y posee una mayor resistencia a enfermedades (Gómez et al., 2007). Es producido en Trinidad y Tobago, Jamaica y muchas plantaciones de Colombia, Venezuela y América Central. Representa el 15% de la producción Mundial (Quintero, 2015).

Por otro lado, desde el punto de vista comercial, el mercado mundial clasifica los granos de cacao de acuerdo al aroma y sabor en dos categorías:

- a) **Cacao fino o de aroma:** producido a partir de las variedades Criollo y Trinitario, en el cual destaca su particular aroma y sabor. Su cultivo se concentra principalmente en el Caribe y América del Sur (Gómez et al., 2007). Es utilizado para la producción de chocolates de alta calidad y revestimientos de coberturas (Quintero, 2015).
- b) **Cacao básico u ordinario:** producido a partir de la variedad Forastero. Representa más del 90% de la producción mundial, siendo África el principal productor (Gómez et al., 2007). Utilizado en la fabricación de polvo, licor y manteca de cacao y productos que tengan una elevada proporción de chocolate (Quintero, 2015).

Adicionalmente, la calidad de los granos de cacao se relaciona con la fermentación, pureza del aroma y la presencia o no de hongos y/o pestes (Tabla 2) (Gómez et al., 2007):

**Tabla 2.** Clasificación de los granos de cacao de acuerdo a su calidad

Característica del grano	Calidad del grano	
	Grado I <sup>1</sup> (% máximo)	Grado II <sup>2</sup> (% máximo)
Hongos visibles	3	4
Sin fermentar	3	8
Infectados con pestes	3	6
Germinados o tamaño insuficiente	3	6

<sup>1</sup> Gómez et al., 2007 <sup>2</sup> End y Dand 2015

Así, la distinción entre las variedades del cacao y estas dos categorías es subjetiva y la clasificación se efectúa de acuerdo con los propios criterios y necesidades del comprador.

## 2.2 Procesamiento del cacao

El procesamiento comienza con la recolección de los frutos de cacao, el cual consiste en la eliminación de las mazorcas maduras de los árboles, tomando en cuenta el color (rojo, amarillo o naranja) y la salud del fruto (Centro de Comercio Internacional, 2001). Luego se extraen las semillas separándolas de la placenta para dar inicio al proceso post-cosecha, el cual consta de dos procesos: la fermentación y el secado (Comisión del Codex Alimentarius, 2014).

Los granos son sujetos a fermentación microbiana durante 5 a 6 días en cestas cerradas de madera, lo que permite el desarrollo de precursores químicos que producen sabores y aromas característicos del cacao. Luego los granos son secados para evitar

que se sobrefermenten, lo que puede llevar al deterioro del producto (Comisión del Codex Alimentarius, 2014). Usualmente, el secado se realiza al sol en camillas de madera o carros corredizos; no se utilizan patios de cemento ni áreas pavimentadas porque puede contaminar los granos de cacao con sustancias nocivas (End y Dand 2015). Debe realizarse paulatinamente, de manera que los sabores y aromas se consoliden al interior del grano de cacao y que el mismo quede listo para ser almacenado sin peligro de que se dañe por acción de los hongos o la humedad (Comisión del Codex Alimentarius, 2014).

Una vez que los granos llegan a las fábricas, se limpian para eliminar restos de piedras, luego los granos son tostados (80°C) y se les extrae la cáscara haciéndolos pasar por una cámara caliente y una cámara de frío. Posteriormente, los granos pasan por una máquina para ser fragmentados y obtener los nibs de cacao. Estos se llevan a los procesos de molienda obteniendo el primer subproducto conocido como licor de cacao o pasta de cacao, el cual es la materia prima de todos los derivados del cacao (Comisión del Codex Alimentarius, 2014). Después se coloca el licor de cacao en la prensa (>10.000 kgf/cm<sup>2</sup>) para obtener dos subproductos, manteca de cacao que representa el 50% del peso total y el polvo de cacao (De La Cruz et al., 2012).

Los usos del licor de cacao, manteca de cacao y polvo de cacao se detallan a continuación (Comisión del Codex Alimentarius, 2014):

- Licor de cacao: materia prima para obtener chocolate, manteca de cacao y polvo de cacao.
- Manteca de cacao: materia prima para obtener chocolate blanco y es usada en la industria cosmética, farmacéutica y alimenticia.
- Polvo de cacao: materia prima para bebidas sabor a chocolate, bombones, galletas y chocolate bombón de baja calidad.

### **2.3 El cacao a nivel mundial**

La forma más común de comercialización desde los países productores a los países consumidores es el cacao en grano y el 35% se comercializa en otras formas como el polvo de cacao, la manteca y el chocolate (Centro de Comercio Internacional, 2001). Según datos de la Organización Internacional del Cacao (ICCO), las zonas de cultivo de cacao son, según su importancia, África Occidental, el Sudeste de Asia y América Latina. Cerca del 72% de la oferta mundial de granos de cacao procede de África Occidental, en especial Costa de Marfil, Ghana y Nigeria, mientras que un 18,3% proviene de América Latina, en especial de Brasil y Ecuador (ICCO , 2017).

La demanda de cacao en grano, en general, está en función de las necesidades tanto de las industrias que generan los subproductos (manteca, pasta y polvo de cacao), como de los fabricantes que elaboran chocolate y otros bienes para el consumo final.

Los criterios que se toman en cuenta para seleccionar un determinado tipo de cacao, se sustentan en aspectos cualitativos y cuantitativos. Entre ellos, el perfil aromático que corresponde a su origen, el rendimiento del grano (tamaño, contenido de manteca de cacao y su dureza), la pureza del grano (sin presencia de agroquímicos, bacterias patógenas, insectos u otros), las propiedades fisicoquímicas de la materia grasa (dureza de la manteca y contenido en ácidos grasos libres). También se toman en cuenta algunos sabores extraños asociados con el moho y el humo que están directamente relacionados con un manejo postcosecha inadecuado (Quintero, 2015).

### 2.3.1 Estado legal de metales pesados en cacao

Un criterio importante que se toma en cuenta para la selección del grano de cacao es el contenido de metales pesados, en especial, el cadmio (Barrueta, 2013) ya que la Unión Europea estableció en el Reglamento N° 488/2014 (Tabla 3), los niveles máximos de cadmio para el chocolate y productos derivados del cacao el cual entró en vigencia a partir del 1<sup>ero</sup> de enero del año 2019 (Unión Europea, 2014) y en el Reglamento N° 2018/73 se estableció los límites máximos de residuos de compuestos de mercurio en determinados productos en el que se menciona el grano de cacao (Tabla 4).

Otros organismos internacionales que establece niveles máximos de metales pesados en cacao y productos derivados son el CODEX- STAN en su reglamento CODEX-STAN 141-1983 en el que estableció los límites máximos de metales pesados y otros compuestos en el cacao; y el Mercado Común del Sur (MERCOSUR), en su Reglamento Técnico MERCOSUR N° 12/11 establece los límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos (MERCOSUR, 2012) el cual está en vigencia desde el año 2012 (Tabla 4).

**Tabla 3.** Contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. Reglamento de la Unión Europea de la Comisión N° 488/2014, aplicable a partir del 1-01- 2019\*

<b>Productos específicos de cacao y chocolate</b>	<b>Niveles Máximos</b> mg kg <sup>-1</sup>
Chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao < 30 %	0,10
Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao < 50 %; chocolate con leche con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 30 %.	0,30
Chocolate con un contenido de materia seca total de cacao ≥ 50 %	0,80
Cacao en polvo vendido al consumidor final o como ingrediente en cacao en polvo edulcorado vendido al consumidor final (chocolate para beber)	0,60

\* Unión Europea, 2014.

**Tabla 4.** Niveles máximos permitidos por organismos internacionales de metales pesados permitidos en granos de cacao y derivados.

Categoría	As	Cd	Cu	Hg	Pb
	mg kg <sup>-1</sup>				
Granos sin cáscara	1,00 <sup>a</sup>	0,6 <sup>b</sup>	30,0 <sup>a</sup>	0,02 <sup>c</sup>	2,00 <sup>a</sup>
Pasta de cacao o licor de cacao <sup>d</sup>	0,50	0,30	-	-	0,50
Chocolates y productos de cacao con menos de 40 % de cacao <sup>d</sup>	0,20	0,20	-	-	0,20
Chocolates y Productos en base de cacao con más de 40 % de cacao <sup>d</sup>	0,40	0,30	-	-	0,40

<sup>a</sup> CODEX-STAN 1983; <sup>b</sup> Unión Europea, 2014 (definición en punto A2 del Anexo I de la Directiva 2000/36/CE)

<sup>c</sup> Unión Europea, 2018; <sup>d</sup> MERCOSUR, 2012.

Las consecuencias de la contaminación que provoca la presencia de metales pesados en el chocolate y productos derivados del cacao es un tema de interés comercial que impacta a la economía de los países productores (Comisión del Codex Alimentarius, 2014).

Venezuela, a pesar de ser un país productor de cacao de buena calidad, presenta una baja producción y exportación (10.641.763 \$ para el año 2012) (Nosis Trade, 2017). Mayormente exporta alrededor de un 98 % de dólares en granos de cacao a Japón, Alemania y Países Bajos (Nosis Trade, 2017), los cuales se caracterizan por ser “fino o de aroma” y son utilizados en la fabricación de chocolate fino, oscuro y gourmet (Quintero, 2015).

La Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN) establece niveles máximos permitidos en metales pesados en granos de cacao (Norma Covenin 50:2018) y en algunos derivados del cacao, como lo son el licor de cacao (Norma COVENIN 1480:1998), el chocolate (Norma COVENIN 52:1995) y cacao en polvo (Norma COVENIN 1479:1998). Estos límites se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Niveles máximos permitidos en Venezuela de metales pesados en granos de cacao y derivados

<b>Categoría</b>	<b>As</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Cd</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Cu</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Fe</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Hg</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Pb</b> mg kg <sup>-1</sup>
Granos de cacao <sup>a</sup>	0,5	0,3	15,0	-	0,005	0,5
Licor de cacao (Masa o pasta de cacao) <sup>b</sup>	1,0	-	5,0	2,0	-	0,5
Chocolate <sup>c</sup>	0,5	-	15,0	-	-	0,5
Cacao en Polvo <sup>d</sup>	1,0	-	5,0	2,0	-	0,5

<sup>a</sup> Norma COVENIN 50:2018 <sup>b</sup> Norma COVENIN 1480:1998 <sup>c</sup> Norma COVENIN 52:1999 <sup>d</sup> Norma COVENIN 1479:1998

Cabe destacar, que las normas venezolanas no toman en cuenta el contenido de cadmio y mercurio en los derivados del cacao. Sin embargo, la Norma COVENIN 50:2018 establece los requisitos que deben cumplir los granos de cacao para ser considerados materia prima apta para la elaboración de derivados destinados al consumo humano.

## 2.4 Cacao en Venezuela

La Denominación de Origen (DO) es un signo distintivo que se le da al producto ya que sus características son conferidas por el lugar donde procede. Así, el cacao venezolano debe su calidad en aroma y sabor debido a sus características químicas, físicas y orgánicas que solamente se deben a la altitud, temperatura, humedad y clima de esa Región en específico (Saber-ULA, 2008). Estas características específicas del cacao le confieren un sabor exclusivo a sus productos derivados como el chocolate.

En Venezuela existen tres zonas cacaoteras ubicadas en las regiones: Centro Norte-Costera, Nor-Oriental, y Sur Oriental. En estas regiones se cultivan diferentes tipos de cacao conocidos por su Denominación de Origen (DO) como lo son Carenero Superior (1), Rio Caribe (2), Chuao y Sur del Lago (3), respectivamente, (González, 1999). En la Tabla 6 se presentan las características más importantes de los cacaos producidos en Venezuela.

**Tabla 6.** Regiones y Zonas de Cacao Denominación de Origen en Venezuela

Región <sup>a</sup>	Estados <sup>a</sup>	Denominación de origen (DO) <sup>a</sup>	Características
Norcentral Costera	Miranda	Carenero	Cruce entre cacaos Trinitarios con cacaos Criollos locales que crecen en Barlovento. El grano tiene un sabor frutal y floral con nuez picante <sup>b</sup> . Cruce entre cacaos Forasteros, Trinitarios y Criollos, que crecen en la zona aragueña de Chuao <sup>c</sup> .
	Aragua Yaracuy Carabobo Guárico	Superior (1)  Chuao	
Nororiental	Sucre Monagas Delta Amacuro	Río Caribe (2)	Cruce entre el cacao Criollo de la Venezuela oriental y los cacaos Forastero provenientes de la cuenca de Amazonas. El grano es largo y grueso, con sabor a ácidos frutales y sutiles tonos a tierra <sup>d</sup> .
Suroccidental	Zulia Mérida Barinas Apure Táchira	Sur del Lago (3)	Cruce entre cacaos Trinitarios con cacaos Criollos locales que crecen en Zulia y Mérida. El grano tiene un sabor amargo y afrutado <sup>e</sup> .

<sup>a</sup> (González, 1999) <sup>b</sup> CIVEN Cacao Industrias Venezolanas (2017), Cacao Carenero Superior; <sup>c</sup> Saber-ULA, (2008); <sup>d</sup> CIVEN Cacao Industrias Venezolanas (2017), Cacao Río Caribe <sup>e</sup> CIVEN Cacao Industrias Venezolanas (2017), Cacao Sur del Lago

## 2.5 Metales pesados en suelos

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad relativamente alta (Hernández et al., 2017), están presentes en concentraciones relativamente bajas en la corteza de la Tierra, suelos y plantas. Muchos de ellos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de plantas, animales y seres humanos, aunque pueden ser tóxicos si se superan ciertos umbrales. Algunos metales pesados son más importantes que otros debido a su alto nivel de toxicidad y disponibilidad, estos son: antimonio, arsénico, cadmio, plomo, cromo, mercurio, níquel, berilio, cobre, plata, selenio y zinc (Galán y Romero, 2008).

La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez transmitidos al medio ambiente, principalmente debido a la actividad industrial y minera, pueden permanecer en el ambiente durante

cientos de años, contaminando el suelo y acumulándose en las plantas y los tejidos orgánicos. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a lo largo de la cadena alimentaria. Los más tóxicos conocidos son el cadmio, mercurio y plomo (Barrueta, 2013).

Los metales pesados en los suelos pueden ser de origen natural o antropogénico. Los primeros son los que provienen de la roca madre a los suelos tras ser liberados por meteorización, por emisiones volcánicas y por la lixiviación de la mineralización; mientras que los de origen antropogénico provienen de las actividades industriales (fábricas de productos químicos, fármacos, pigmentos), minería, industria agrícola (riego, fertilizantes inorgánicos, pesticidas) y residuos sólidos humanos (Galán y Romero, 2008).

En la Tabla 7 se presentan los intervalos de concentración normales y anómalos de algunos metales pesados en los suelos.

**Tabla 7.** Intervalo de concentraciones geoquímicas normales y anómalas de algunos metales pesados en suelos<sup>a</sup>

<b>Elemento</b>	<b>Normal</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Anómalos</b> mg kg <sup>-1</sup>
As	< 5 - 40	Hasta 2500
Cd	< 1 - 2	Hasta 2000
Cu	< 2 - 60	10 - 100
Ni	2 - 100	Hasta 8000
Pb	10 - 150	1000 o más
Se	< 1 - 2	Hasta 500
Zn	25 - 200	10000 o más

<sup>a</sup> Galán y Romero, 2008

Cuando los metales pesados son incorporados al suelo pueden ser neutralizados, degradados o adsorbidos por procesos de adsorción específica o cambio iónico, acomplejado o precipitado. La salida del sistema puede ser por volatilización, extracción por las cosechas, drenaje o procesos de erosión. Como resultado final se produce la retención o movilización de sustancias que contienen metales pesados que pueden

afectar en mayor o menor medida a los organismos vegetales y animales (Hernández et al.,2017).

Unos de los factores más importantes que influyen en la movilidad de estos metales en el suelo son el pH y la textura, ya que intervienen en los procesos de absorción, precipitación, en la formación de complejos y reacciones de óxido-reducción (Hernández et al.,2017) .

Por lo general, los suelos donde se cultiva el cacao son de tendencia ácida y de suelo arcilloso, típico de la región húmeda tropical (Barrueta, 2013). Aquí, la absorción de metales pesados es mayor debido a que tienden a estar más disponibles bajo estas condiciones y una vez disponibles, pueden ser absorbidos por la planta de cacao. Sin embargo, la distribución y acumulación de los metales en la planta es variable (Arévalo et al., 2016)

En el caso del cadmio, no se conoce un papel fisiológico definido en la planta, pero su entrada a este ser vivo viene dado por las proteínas encargadas de transportar el calcio, LCT1, y la proteína IRT1, que pertenece a la familia transportadora de Zn y Fe (Rodríguez et al., 2008). El Cd puede concentrarse en las raíces, hojas o partes comestibles como los granos (Arévalo et al., 2016).

Desde que la Unión Europea emitió el Reglamento N° 488/2014, los productores de algunos países han sentido la necesidad de estudiar los suelos donde es cultivado el cacao. Algunos de estos estudios se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Contenido de cadmio en suelos donde se cultiva cacao

País		Profundidad	Concentración	Referencia
		cm	mg kg <sup>-1</sup>	
Ecuador	No fertilizado	0 - 15	0,88 - 2,45	Chávez et al., (2015)
Honduras	No fertilizado	0 - 10	0,25 ± 0,02	Gramlich et al., (2017)
Ghana	No fertilizado	0 - 15	0,035	Takrama et al., (2015)
	Fertilizado	0 - 15	0,047	
	Forestales	0 - 15	0,035	

Como se puede observar, la concentración del Cd en los suelos de las regiones de cultivo de cacao de Ghana es mucho menor que en los suelos del continente Americano, donde los niveles se encuentran en el límite superior del intervalo de concentraciones normales (ver Tabla 7).

## 2.6 Contenido de metales pesados en cacao y sus derivados

Los metales pesados que están en los alimentos provienen de diversas fuentes, las más importantes son la composición mineralógica del suelo en el que se producen los alimentos para el hombre y los animales, los lodos residuales, los fertilizantes químicos y plaguicidas empleados en la agricultura (Barrueta, 2013)

En el caso del cacao, el árbol absorbe ligeramente los metales pesados que existen por naturaleza en los suelos y los concentra en las semillas grasosas. Los granos, la manteca, el polvo de cacao y los productos de chocolate pueden contener niveles de trazas de metales pesados tales como Cd, Cr y Ni; mientras que la cáscara del grano, es desechada durante la producción de polvo de cacao y manteca y contiene principalmente niveles trazas de As, Bi y Pb. En el chocolate, la concentración de estos elementos aumenta con el contenido sólido de cacao (Bertoldi et al., 2016).

### **2.6.1 Contenido de metales pesados en granos de cacao**

Estudios recientes informan que el grado de concentración de metales pesados en granos de cacao varía con la variedad y con el sitio geográfico. Esto ha generado interés en diversos países productores y han centrado sus investigaciones en la determinación del contenido de metales pesados no solo en el cacao, sino también en productos que se elaboran en base de cacao.

Bertoldi, et al. en 2016, estudiaron el contenido de diversos elementos en muestras de granos de cacao, la mayoría de variedad forastero, fermentados y secados procedentes de África Occidental, Centroamérica y Suramérica; y en muestras comerciales de chocolate oscuro con un contenido de sólidos de cacao > 60 %. Otros estudios han demostrado que los niveles de metales pesados en granos de cacao varían considerablemente entre regiones, países y aún entre áreas dentro de un país (Mounicou et al., 2003; Chávez et al., 2015; Takarama et al., 2015; Lanza et al., 2016; Arévalo et al., 2017; Gamlich et al., 2017).

En la Tabla 9 se muestra el contenido de algunos elementos de interés como el As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn presentes en los granos de cacao, observándose que el contenido de estos metales varía entre las diferentes áreas geográficas. Para el caso del cadmio, el área de menor concentración se presentó en África Occidental, y los provenientes de Suramérica tienen inherentemente mayores niveles, específicamente en Venezuela, en la localidad del Zulia, seguido de Perú en la localidad de Tumbes. También hay que considerar que los resultados están afectados por la presencia o no de la cáscara del grano.

Los elevados 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 (Comisión del Codex Alimentarius, 2014)). Por ello, conocer el origen de la contaminación es fundamental para determinar las acciones a seguir y para establecer la calidad del producto (Barrueta, 2013).

**Tabla 9.** Contenido de metales pesados en los granos de cacao de diferente origen geográfico

Elemento	Área Geográfica	País	Localidad	Concentración mg kg <sup>-1</sup>	Referencia
Cd	África Occidental	Varios Países Ghana		0,0926 ± 0,0418 <sup>c</sup> 0,248 - 0,336 <sup>c</sup>	Bertoldi et al., 2016 * Takrama et al., 2015
			Centroamérica	Varios Países Honduras	Norte
	Suramérica	Varios Países Ecuador	Sur	1,388 ± 1,089 0,94 <sup>b</sup>	Bertoldi et al., 2016 * Chávez et al., 2015
			El Oro	0,372 ± 0,052 <sup>c</sup>	Mounicou et al., 2003
		Perú	Cuzco	0,17 ± 0,41 <sup>a</sup>	Arévalo et al., 2017
		Tumbes	1,8 ± 0,4 <sup>a</sup>		
Venezuela	Zulia	1,90 - 2,09 <sup>b</sup> 1,74 - 1,82 <sup>d</sup>	Lanza et al., 2016 Arévalo et al., 2017		
Cu	Suramérica	Varios Países Perú	Cuzco	20,8 ± 3,0 <sup>c</sup> 18,75 ± 3,91 <sup>a</sup>	Bertoldi et al., 2016 * Arévalo et al., 2017
			Amazonas	30,41 ± 1,41 <sup>a</sup>	
		Venezuela	Zulia	16,38 - 21,36 <sup>b</sup> 14,25 - 21,19 <sup>d</sup>	Lanza et al., 2016
Cr	Suramérica	Varios Países Perú	San Martin	1,43 ± 1,04 <sup>c</sup> 1,00 ± 0,87 <sup>a</sup>	Bertoldi et al., 2016 * Arévalo et al., 2017
			Amazonas	4,83 ± 1,41 <sup>a</sup>	
		Venezuela	Zulia	0,34 - 0,44 <sup>b</sup> 0,29 - 0,34 <sup>d</sup>	Lanza et al., 2016
Ni	Suramérica	Varios Países Perú	Tumbes	6,53 ± 2,01 <sup>c</sup> 3,5 ± 2,00 <sup>a</sup>	Bertoldi et al., 2016 * Arévalo et al., 2017
			Huanuco	9,25 ± 2,00 <sup>a</sup> 4,37 <sup>b</sup>	
Pb	Suramérica	Venezuela		4,37 <sup>b</sup>	Lanza et al., 2016
		Varios Países Ecuador	El Oro	0,0676 ± 0,0283 <sup>c</sup> 0,042 ± 0,013 <sup>c</sup>	Bertoldi et al., 2016 * Mounicou et al., 2003
			Perú	Cajamarca	1,00 ± 0,67 <sup>a</sup>
			Cuzco	3,78 ± 0,39 <sup>a</sup>	
As	Suramérica	Varios Países		0,0412 ± 0,0181	Bertoldi et al., 2016 *
Zn	Suramérica	Varios Países		47,4 ± 3,5	Bertoldi et al., 2016 *

\*Procedencia de muestras (Bertoldi et al., 2016):

- África Occidental: Congo (1), Ghana (4), Costa de Marfil (4), Nigeria (4), San Tomé y Príncipe (6) y Sierra Leona (2). n=21

- Centro América: Cuba (1), República Dominicana (5), Granada (1), México (2) y Trinidad (1). n=10

- Suramérica: Brasil (1), Ecuador (2), Perú (7) y Venezuela (4). n=14

Característica del grano: <sup>a</sup> No fermentados con cáscara. <sup>b</sup> No fermentados sin cáscara. <sup>c</sup> Fermentados con cáscara.

<sup>d</sup> Fermentados sin cáscara.

También se han realizado estudios sobre el contenido de cadmio en las cáscaras del grano de cacao, los resultados se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Contenido de cadmio en cáscaras del grano de cacao

País	Localidad	Concentración mg kg <sup>-1</sup>	Referencia
Ghana	---	0,275 - 0,336	Takrama et al., 2015
Ecuador	Sur	0,02 - 0,46	Chávez et at., 2015

En las Tablas 9 y 10 se observa que el contenido de cadmio en las cáscaras del grano fue menor que en el grano. Chávez et al., (2015) sugieren que la distribución de este elemento en la planta de cacao generalmente decrece en el orden de granos > cáscara >> hojas. En el estudio de Chávez et al., (2015), el cadmio fue detectado en cáscaras únicamente cuando la concentración de Cd en granos era > 1 mg kg<sup>-1</sup> y sugiere que estos datos merecen más atención ya que el 60% de los sitios estudiados tenía una concentración de Cd en granos por encima del umbral (0,8 mg kg<sup>-1</sup>).

### 2.6.2 Contenido de metales pesados en derivados de cacao

Se ha determinado el contenido de metales pesados en los productos de las diferentes etapas de producción de cacao, como lo es el polvo y la manteca de cacao. Mounicou et al. en 2003 realizaron un estudio en muestras suministradas por la Nestlé procedentes de la provincia El Oro en Ecuador y Venezuela.

En la Tabla 11 se observa que la concentración de metales pesados varía con el origen geográfico y que el contenido de cadmio se encuentra casi totalmente en el cacao en polvo y no en la manteca. El contenido de cadmio y plomo en las muestras de

Venezuela se encuentra en mayor proporción en el polvo de cacao. En el caso del plomo, los resultados de las muestras venezolanas contrastan con los obtenidos para las muestras de Ecuador. (Mounicou et al., 2003).

**Tabla 11.** Contenido de cadmio y plomo en polvo de cacao y manteca de cacao<sup>a</sup>

<b>Elemento</b>	<b>País</b>	<b>Cacao en Polvo</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Manteca de cacao</b> mg kg <sup>-1</sup>
Cd	Ecuador	0,533 ± 0,016	0,011
	Venezuela	1,833 ± 0,02	0,007
Pb	Ecuador	0,011 ± 0,003	0,022 ± 0,001
	Venezuela	0,173 ± 0,012	0,015 ± 0,002

<sup>a</sup>Mounicou et al., 2003.

Es importante observar que la concentración de cadmio en el polvo de cacao en las muestras de Ecuador son más altos que sus concentración en el grano de cacao (Tabla 9), esto indica que la mayor parte de la contaminación de este elemento en este producto se origina después de que los granos son enviados para la fabricación de productos derivados de cacao y chocolate (Mounicou et al., 2003).

Por otro lado, hay productos tales como barras de chocolate, polvo de cacao, galletas, helados, bombones, entre otros, que contienen desde un 20% hasta un 90% de sólidos de cacao. Ciertos estudios sugieren que específicamente en chocolate existe una relación, directamente proporcional entre el contenido de sólidos de cacao y trazas de metales pesados (Bertoldi et al., 2016).

En la Tabla 12, se resume una serie de estudios realizados en la determinación de metales pesados en chocolate con diferente porcentaje de cacao.

**Tabla 12.** Contenido de metales pesados en chocolate oscuro de diferente origen<sup>a</sup>

Elemento	Área Geográfica	País	% Cacao	Concentración mg kg <sup>-1</sup>
Cd	África Oriental	Varios Países	62 - 100	0,201 ± 0,031
		Madagascar	64 ; 85	0,18 ; 0,22
	Suramérica	Varios Países		0,615 ± 0,398
		Ecuador	66 ; 100	0,33 ; 0,44
Perú		100	0,87	
Pb	Suramérica	Varios Países	71 ; 72 ; 100	0,82 ; 0,84 ; 1,28
		Venezuela	71	0,0235 ± 0,025 0,08
As	Suramérica	Varios Países	62 - 100	0,0199 ± 0,0144
		Venezuela	71	0,04

<sup>a</sup> Bertoldi et al., 2016, Procedencia de muestras: África Oriental: Madagascar. n=2 ; Suramérica: Brasil (1), Ecuador (2), Perú (7) y Venezuela (4). n=8

Como se puede observar, los chocolates de Venezuela y Perú superan el nivel máximo permitido de cadmio (0,8 mg kg<sup>-1</sup>) por el Reglamento N° 488/2014 de la Unión Europea. Este resultado concuerda con el análisis realizado en granos de cacao (Tabla 9).

Bertoldi, et al. (2016) sugieren que el contenido de Cd en el chocolate está relacionado con el contenido original en el cacao. En el caso del contenido de Pb podría ser debido principalmente a la contaminación durante el proceso de producción y en menor medida a los granos (Bertoldi, et al., 2016). Mientras que para el arsénico la mayor parte de su contenido se encuentra en la cáscara del grano (Yanus et al., 2014).

En la Tabla 13 se muestra un resumen de la metodología analítica empleada para la determinación de metales pesados en cacao y derivados, la técnica utilizada y algunas observaciones importantes como el límite de detección, el estándar de certificación y el estándar de calibración.

**Tabla 13.** Resumen de los estudios realizados en cacao y sus derivados

Referencia	Elemento	Muestra (n)	Tratamiento de Muestra	Técnica	Observaciones
Arévalo et al., 2017	Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn.	-Granos (72) -Hojas (72)	-500 mg c/u secados en horno a 60°C. -Digestión con 10 mL de mezcla HNO <sub>3</sub> (65 %) y HClO <sub>4</sub> (98 %) relación 4:1 -Microondas: 120°C por 3 h luego 200°C 2 h. -Filtrado: papel filtro N° 42	AAS	Análisis por triplicado
Gramlich et al., 2017	Cd Fe Zn	-Hojas -Granos sin fermentar. -Cáscara del grano	- Hojas, cáscaras y granos secados en estufa a 70°C por 72 h. - Molienda de muestra. - Digestión de la muestra siguiendo el método EPA 3050.	GF AAS FAAS	Análisis por duplicado.
Bertoldi et al., 2016	As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn	-Granos (61) -Chocolate (30)	-25 g de granos pulverizados en mezcladora eléctrica. -100 g chocolate rallado manualmente con rallador plástico. -0,5 g de muestra + 4 mL HNO <sub>3</sub> digestión asistida con horno microondas. -Dilución con agua.	ICP-MS	<b>Estándar de Calibración:</b> ICP multi-elemental standard solution VI. <b>Estándar de Certificación:</b> Peanut Butter (SRM 2387) Typical Diet' (SRM 1548a) Peach leaves (SRM1547)
Lanza et al., 2016	Cd, Cu, Ni, Cr, Fe	Granos: -Fermentados (1) -Sin fermentar sin cáscara (1).	-Secado en estufa con aireación a 100°C por 30 min. - Descascarillado de los granos a T ambiente. -Triturar la almendra con homogeneizador. -Digestión: adaptación de Mounicou et al. (2003), 1,0 g en 8 mL HNO <sub>3</sub> (c) en horno microondas.	ICP-OES	Estándar de Calibración: -ICP multi-elemental standard solution IV. -ICP multi-elemental standard XIII
Chávez et al., 2015	Cd	-Hojas -Granos sin fermentar. -Cáscara del grano	-Hojas secado en horno a 70°C por 72 h; granos y cáscara al natural. -Pulverización: molino de bolas inoxidables. Mortero (granos) -0,4 g muestra es digerida en 6 mL HNO <sub>3</sub> a 80°C y 140°C por 180 min. -Diluir con 25 mL agua destilada nanopura -Filtrar con membrana de filtro 0,45 µm	ICP-OES	Análisis por triplicado LD: 0,1 µg L <sup>-1</sup> .
Takrama et al., 2015	Cd	Granos fermentados (1)  Cáscara del grano (1)	-Molienda en mortero (20 g) -1 g digerado en 40 mL agua regia -Filtrar  -Molienda en mortero (3 g) -Digestión en agua regia (1 g) -Filtrar	FAAS	LD: 0,005mg kg <sup>-1</sup>
Mounicou et al., 2003	Cd, Pb	- Polvo de cacao - Manteca	- 0,2 g de muestra en HNO <sub>3</sub> (c) en sistema cerrado del horno microondas. - Dilución con agua ultrapura.	ICP-MS	<b>Estándar de Certificación:</b> NIST SRM 8433 (Corn Bran)

## 2.7 Zona de estudio

En este trabajo se analizarán muestras de cacao provenientes de una hacienda, ubicada en la Región de Barlovento, en el estado Miranda, municipio Acevedo, en la parroquia Panaquire.

El informe Geo-Ambiental del Estado Miranda (2011) indica que el municipio Acevedo está ubicado en el centro del estado Miranda en la región de Barlovento. Está dividido en ocho (8) parroquias: Araguaita, Arévalo González, Cayapa, Caucagua, Panaquire, Ribas, El Café y Marizapa.



**Figura 2.** Mapa del Estado Miranda, Municipio Acevedo

La composición litológica es de esquistos cuarzo - micáceos, granulación gruesa a fina muy meteorizados; la parte esquistosa presenta suelos de textura franco - arcillosa, por zonas con un alto contenido de arcilla en el perfil (residuales en las montañas); hacia la planicie aluvial, la alta mesa freática, la lenta percolación y las intensas precipitaciones favorecen la formación de pantanos (Instituto Nacional de Estadística., 2011).

La vegetación es considerada como bosque húmedo tropical. Presentando cultivos de café, cacao y caña de azúcar. Posee una temperatura media 26,4°C y precipitación promedio de 2.156,6 mm anuales (Instituto Nacional de Estadística., 2011).

La zona se encuentra influenciada por inundaciones del Rio Tuy, ubicado en la región Nor-Central de Venezuela, la cual comprende la parte Centro Oriental del Estado Aragua y la parte Central del Estado Miranda. Entre los principales afluentes, que drenan hacia este Río, están los ríos Ocumarito, Sucuta, Guaire, entre otros, los cuales presentan una contribución importante sobre la composición química del Río Tuy que es la corriente principal de esta cuenca hidrográfica. Localidades como Panaquire, Guayas, Tacata y Hacienda Santa Teresa presentan un gran desarrollo de actividades domésticas, agropecuarias e industriales que también pueden influir en la composición química de este Río (Henríquez, 2011).

Mogollón et al., 1990, estudiaron el contenido de metales pesados en sedimentos procedentes de diferentes localidades de la cuenca del Rio Tuy recolectados en los 1979, 1981,1984 y 1986. El contenido de Fe, Mn, Cu, Pb y Zn en muestras colectadas en el año 1979 se presentan en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Contenido de metales en muestras de sedimentos de la cuenca del Río Tuy colectados en el año 1979

<b>Muestra</b>	<b>Fe</b> %	<b>Mn</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Cu</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Pb</b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>Zn</b> mg kg <sup>-1</sup>
Tuy (Buen Paso) <sup>a</sup>	1,8	270,0	18	15	56
Ocumarito	4,8	1100	77	21	81
Sucuta	3,8	910	70	35	68
Guaire	2,8	310	30	62	110
Tuy (Hda. Sta. Teresa)	3,0	310	39	24	92
Panaquire	3,1	490	37	36	95
Panaquire <sup>b</sup>	3,5	597	81	116	201

Mogollón et al., 1990.

<sup>a</sup> No contaminado

<sup>b</sup> Concentración promedio de las muestras colectadas en los años 1979, 1981,1984 y 1986

Los datos de la Tabla 14 muestran que los sedimentos del Río Guaire y Panaquire presentan mayor grado de contaminación en términos de Pb y Zn debido a que estos sitios están influenciados por desechos industriales, agrícolas y domésticos. En el caso de los elevados niveles de Fe y Mn fueron atribuidos a la meteorización química, las altas precipitaciones y la alta densidad de vegetación (bosque tropical). Así, el 70% de las muestras analizadas del canal principal del Río Tuy mostraron elevados niveles de metales pesados atribuidos a las fuentes antropogénicas que ejercen una gran influencia en el contenido químico del sedimento.

Henríquez (2011) determinó el contenido de cadmio a distintas distancias del Río Tuy obteniendo un intervalo de concentración de  $0,5 - 1,1 \text{ mg kg}^{-1}$ , producto de los efluentes domésticos, agropecuarios e industriales de las poblaciones de Tejerías, Cúa y Guayas. En el caso de las zonas Santa Teresa hasta Panaquire se observó que la concentración se mantuvo relativamente constante a  $0,7 \text{ mg kg}^{-1}$ .

En base a la información revisada, teniendo en cuenta que el contenido de metales de los suelos de cultivo afecte al correspondiente en los productos agrícolas y la entrada en vigencia del Reglamento 488/2014 de la Unión Europea a partir del 1<sup>er</sup> de enero de 2019 se plantea la determinación de metales pesados en cacao de una hacienda, ubicada en la Región de Barlovento, Edo Miranda en la parroquia Panaquire, y en chocolate comercial producido en Venezuela con diferente denominación de origen.

### **III OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Evaluar el contenido de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn en granos de cacao procedentes de la región de Barlovento y chocolate comercial venezolano.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Optimizar las metodologías analíticas para la determinación de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn en granos de cacao y chocolate comercial venezolano.
- Determinar los niveles de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn en granos de cacao procedentes de la región de Barlovento y chocolate comercial venezolano.
- Comparar las concentraciones de metales obtenidas en los granos de cacao y chocolates comerciales venezolanos analizados con los valores en nacionales e internacionales vigentes.
- Estudiar posibles relaciones entre el contenido de los elementos en el grano de cacao y el pH determinado en suelos de la misma zona de cultivo.

## IV PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Equipos

Las muestras de cacao en grano fueron secadas en una estufa marca Imperial V Laboratory Oven.

La digestión de las muestras se realizó en un digestor de microondas marca CEM, modelo MDS 2000, con una potencia de 630 watts. Este equipo cuenta con un control de presión (máximo 200 psi) y temperatura (máximo 200 °C). Se emplearon recipientes para altas presiones, ACV-50.

La determinación de la concentración de los metales se llevó a cabo empleando los siguientes equipos:

- Espectrofotómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica (ET AAS), marca Perkin Elmer, modelo SIMAA 6000. El espectrofotómetro está equipado con un corrector de fondo basado en el efecto Zeeman longitudinal; emplea hornos calentados transversalmente (THGA) y un detector CMOS con capacidad de detección simultánea de hasta 6 elementos.
- Espectrofotómetro de absorción atómica con llama (FAAS) marca Analytik Jena, modelo novAA 350. El equipo consta de un monocromador Czerny - Turner de haz sencillo y doble haz, una rejilla holográfica con longitud focal de 279,7 / 252,6 mm, 1800 líneas/mm y un detector fotomultiplicador UV con respuesta espectral en el intervalo de 185 a 900 nm.
- Espectrofotómetro de fluorescencia atómica con vapor frío (CV AFS), marca Analytik Jena, modelo Mercur. Este espectrofotómetro cuenta con un automuestreador AS-52 y doble amalgama de oro, de uso optativo. Longitud de onda de detección 253,7 nm.

## 4.2 Reactivos

Se emplearon estándares unielementales de 1000 mg L<sup>-1</sup> de As, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Ni, Pb y Zn marca Assurance® Spex Certiprep, soluciones de 10 000 mg L<sup>-1</sup> de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificadores químicos y Tritón X-110 marca Sigma-Aldrich como surfactante.

Los reactivos utilizados en el procedimiento de digestión total de las muestras fueron: ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 65 % p/p, de marca Riedel de Haën y agua destilada y desionizada de 18 MΩ.

La determinación de Hg total por CV AFS se realizó empleando: clorhidrato de hidroxilamina (NH<sub>2</sub>OH.HCl) al 98 % p/p, marca Scharlau; ácido clorhídrico (HCl) al 35 % p/p, marca Riedel de Haën; cloruro de estaño (SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) (Certificado T142 - 500, Hg ≤ 0,005 ppm) y bromuro de potasio (KBr) (Certificado P205 - 500, Hg ≤ 0,005 ppm), ambos de marca Fisher Chemicals; y bromato de potasio (KBrO<sub>3</sub>) al 99,9 % marca Dowell.

El ácido nítrico fue tetradestilado y el ácido clorhídrico fue tridestilado en un destilador de teflón que opera por debajo del punto de ebullición.

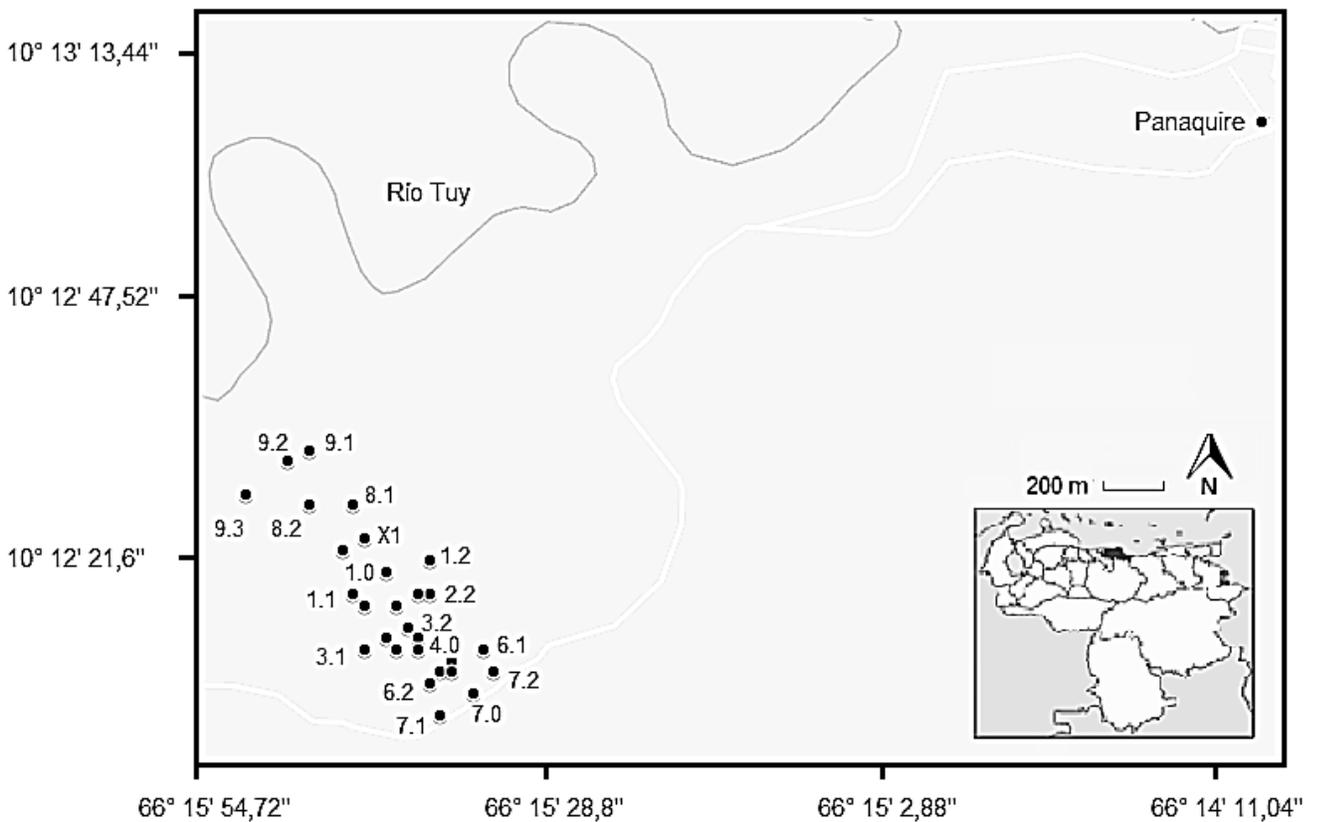
## 4.3 Metodología

### 4.3.1 Muestreo

Las muestras de cacao fueron colectadas en una hacienda ubicada en la región de Barlovento, estado Miranda, municipio Acevedo en la parroquia Panaquire en Venezuela.

Debido a razones logísticas relacionados con el acceso a la hacienda, el muestreo se realizó en dos etapas. La primera se realizó el día 22 de noviembre de 2017 y la

segunda se realizó el día 23 de marzo de 2018. Entre ambas etapas de muestreo no ocurrieron lluvias o inundaciones por el Río Tuy que produjeran efectos sobre los frutos. Los frutos de cacao recolectados fueron aquellos que estuvieran maduros y listos para su colecta. En la primera etapa se hizo el muestreo en la sección que va desde el centro de la hacienda (donde suele llegar la inundación periódica del río Tuy) hasta la carretera, y se recolectó una o dos mazorcas de cacao maduro de árboles cercanos en 21 puntos. En la segunda etapa, se recolectó una mazorca de cacao maduro en 7 puntos en la sección que va desde el centro de la hacienda hacia el río Tuy. En todos los puntos se colectaron muestras de suelo. En la Figura 3 se presentan algunas coordenadas satelitales y en la Tabla 15 se presentan las coordenadas GTM de cada sitio de muestreo.



**Figura 3.** Muestreo de mazorcas de cacao en la hacienda

**Tabla 15.** Coordenadas de muestreo de las mazorcas de cacao en la hacienda

Muestreo	ID	N° muestra	Coordenada GTM		Distancia al Río m
			Norte	Oeste	
1 <sup>era</sup> Etapa	1.0	1	10° 12' 18"	66° 15' 41"	613,9
	1.1	1	10° 12' 16"	66° 15' 44"	617,9
	1.2	1	10° 12' 19"	66° 15' 37"	655,0
	2.0	2	10° 12' 15"	66° 15' 40"	716,1
	2.1	1	10° 12' 15"	66° 15' 43"	664,9
	2.2	2	10° 12' 16"	66° 15' 37"	734,4
	3.0	2	10° 12' 13"	66° 15' 39"	782,5
	3.1	1	10° 12' 11"	66° 15' 43"	772,1
	3.2	1	10° 12' 16"	66° 15' 38"	718,4
	4.0	1	10° 12' 12"	66° 15' 38"	823,1
	4.1	2	10° 12' 12"	66° 15' 41"	773,9
	4.2	1	10° 12' 11"	66° 15' 40"	818,7
	5.0	1	10° 12' 9"	66° 15' 36"	932,6
	5.1	1	10° 12' 11"	66° 15' 38"	828,5
	5.2	1	10° 12' 10"	66° 15' 35"	848,9
	6.0	1	10° 12' 9"	66° 15' 35"	946,1
	6.1	1	10° 12' 11"	66° 15' 32"	944,3
	6.2	2	10° 12' 8"	66° 15' 37"	940,0
	7.0	2	10° 12' 7"	66° 15' 33"	1031,6
	7.1	1	10° 12' 5"	66° 15' 36"	1038,9
7.2	1	10° 12' 9"	66° 15' 31"	1011,9	
2 <sup>da</sup> Etapa	X1	1	10° 12' 21,0"	66° 15' 43,0"	507,6
	X2	1	10° 12' 20,3"	66° 15' 45,0"	503,5
	8.1	1	10° 12' 24,9"	66° 15' 44,6"	416,2
	8.2	1	10° 12' 24,4"	66° 15' 48,6"	347,6
	9.1	1	10° 12' 29,2"	66° 15' 48,3"	221,9
	9.2	1	10° 12' 28,3"	66° 15' 50,7"	203,7
	9.3	1	10° 12' 25,7"	66° 15' 54,0"	206,3
<b>N total</b>		<b>34</b>			

Las muestras de chocolate comercial fueron compradas en establecimientos comerciales en la ciudad de Caracas, Distrito Capital. En total se contó con 14 chocolates, los cuales fueron clasificados por marcas A, B y C y las denominaciones de origen (DO): Carenero Superior (1), Rio Caribe (2) y Sur del Lago (3). En la Tabla 16, se muestran las especificaciones de las muestras de chocolate comercial.

**Tabla 16.** Especificaciones de las muestras de chocolate comercial

DO <sup>a</sup>	Marca	%Cacao m/m	Masa total (g)	Fecha Emisión	Fecha Vencimiento	Lote
1	A	34	80	Nov - 16	Nov - 18	EN2T
1	A	41	80	Ago - 17	Ago - 19	D2T
2	C	50	92	Nov - 17	Nov - 19	1754
1	A	58,5	80	Ago - 17	Ago - 19	2C1T
1	B	60	60	N/E <sup>b</sup>	May - 18	CQ19
2	C	60	92	Nov - 17	Nov - 19	1753
2	B	60	60	N/E <sup>b</sup>	Jul - 18	CA03
3	B	60	60	N/E <sup>b</sup>	Abr - 18	CJ07
3 <sup>c</sup>	B	60	60	N/E <sup>b</sup>	May - 18	BY02
1	A	61	80	Jun - 15	Jun - 17	3C2T
1	A	70	80	Sep - 17	Sep - 19	B2T
2	C	70	92	Nov - 17	Nov - 19	1751
3	A	70	80	Oct-17	Oct - 19	4B1T
1	A	73,5	80	Mar - 18	Mar - 20	1B2T

<sup>a</sup> DO: Denominación de origen: 1: Carenero Superior, 2: Río Caribe, 3 Sur del Lago

<sup>b</sup> N/E: No Especifica ; <sup>c</sup> Chocolate de cobertura

#### 4.3.2 Pre-tratamiento de muestras

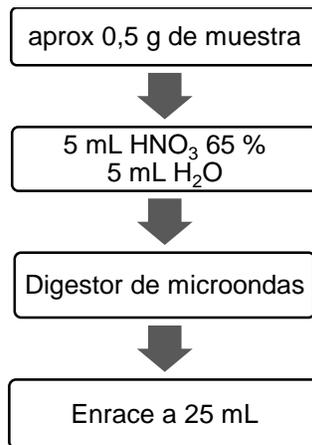
Las mazorcas de cacao fueron llevadas al laboratorio del Centro de Química Analítica (CQA). Se tomaron las medidas de longitud y diámetro de las mazorcas, y posteriormente se abrieron empleando instrumentos de plástico, para separar los granos de la placenta del fruto. Los granos de cacao fueron descascarillados a mano, usando guantes de plástico, y secados en la estufa a 38 - 42 °C durante 3 días. Una vez secos, los granos de cacao fueron molidos empleando un molino eléctrico de acero inoxidable.

Los chocolates fueron fundidos lentamente en un beaker, empleando como forma de calentamiento un baño de agua < 38 °C, para evitar que el chocolate hirviera. Posteriormente la mezcla se homogenizó con una cucharilla de plástico, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se colocó en la nevera por 45 min. Finalmente, la muestra fue triturada con la cucharilla y se guardó el chocolate en papel antigrasa y bolsa hermética.

Los utensilios empleados se mantuvieron en HNO<sub>3</sub> 5% por al menos 24 h antes de ser usados.

### 4.3.3 Tratamiento químico de las muestras

El procedimiento optimizado para la digestión de granos de cacao y chocolate se muestra en la Figura 4 y el programa del digestor de microondas se muestra en la Tabla 17. La optimización de la digestión de las muestras incluyó variaciones en las proporciones de ácido y agua, así como la posible inclusión de  $H_2O_2$ , y el tiempo y presión en el digestor de microondas. El  $H_2O_2$  fue descartado por el aumento de presión observado en los envases de digestión que ocasionó el daño acelerado de los mismos.



**Figura 4.** Esquema para la digestión total de las muestras de granos de cacao y chocolate

**Tabla 17.** Programa del digestor de microondas optimizado para la digestión total de granos de cacao y chocolate

<b>Etapa</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Power	57	57	57	57
Presión (psi)	50	60	70	75
Tiempo Rampa (min)	8	10	20	10
TAP*(min)	5	5	5	5

Programa para ocho envases

\*Tap: tiempo que permanece la muestra a la presión indicada.

#### 4.3.4 Análisis Químico.

##### ▪ Determinación simultánea de As, Cd, Cu, Ni, Cr y Pb mediante ET AAS

El contenido de As, Cd, Cu, Ni, Cr y Pb en las muestras de granos de cacao y chocolate se determinó de manera simultánea por ET AAS.

La optimización del programa de calentamiento para la determinación multielemental de Cd, Cu, Cr, Ni y Pb, se realizó estudiando las temperaturas de calcinado y de atomización para las muestras: solución estándar acuosa en HNO<sub>3</sub> 0,1% m/v, solución de granos de cacao, y solución de chocolate con porcentaje de cacao 41% y 73,5%. Todas las soluciones se ajustaron a 0,1% m/m de Triton X-100. Se empleó la mezcla de 3 µg de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 5 µg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificador químico y el volumen de inyección fue de 20 µL. El programa general de calentamiento se muestra en la Tabla 18.

En la Tabla 19 se muestran las longitudes de onda y los tiempos de lectura empleados para cada analito en la optimización de las condiciones en ET AAS. Los tiempos de lectura fueron seleccionados para cada elemento de acuerdo a experiencias preliminares realizadas.

**Tabla 18.** Programa de temperatura para la determinación simultánea de Cd, Cu, Cr, Ni y Pb

Etapa	Temperatura °C	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de permanencia (s)	Flujo de Ar mL/min
<b>Secado I</b>	110	5	20	250
<b>Secado II</b>	130	5	20	250
<b>Calcinado</b>	<b>A optimizar</b>	10	<b>A optimizar</b>	250
<b>Enfriamiento</b>	30	1	3	250
<b>Atomización</b>	<b>A optimizar</b>	0	5*	0
<b>Limpieza</b>	2450	1	3	250

\*Tiempo de Lectura

**Tabla 19.** Condiciones Instrumentales empleada para las medidas de ET AAS

<b>Elemento</b>	<b><math>\lambda</math></b> nm	<b>Tiempo de lectura</b> s	<b>Intervalo</b> $\mu\text{g L}^{-1}$
As	193,7	3,0	6,3 - 25,0
Cd	228,8	3,0	0,75 - 6,00
Cu	324,8	4,0	12,5 - 150
Cr	357,9	4,0	1,0 - 10,0
Ni	232,0	4,0	12,5 - 100,0
Pb	283,3	3,5	1,25 - 20,00

#### ▪ **Determinación de Zn mediante FAAS**

El contenido de Zn en las muestras de cacao y chocolate se determinó mediante FAAS, usando la mezcla acetileno-aire y las condiciones de operación las indicadas en el manual del equipo. La determinación de Ca, Fe, Hg, Mg, Mn no pudo ser realizada por problemas instrumentales en los equipos de FAAS y CV-AFS que no pudieron resolverse.

#### **4.3.5 Técnicas cuantitativas de análisis del contenido metálico**

En ET AAS, las técnicas cuantitativas empleadas fueron la curva de calibración externa para los granos de cacao y la curva de adición estándar para los chocolates. En FAAS, la técnica cuantitativa aplicada fue la curva de calibración con estándar externo. El análisis del contenido metálico se realizó con duplicados independientes, empleado las metodologías optimizadas.

El porcentaje de recuperación (% R) de las metodologías fue empleado como figura de mérito de la exactitud, ya que no se dispuso de las muestras de referencia certificadas. Para la determinación del % R las muestras se contaminaron con cantidades conocidas de estándares acuosos de cada elemento previo a su digestión. La determinación del %R se calculó mediante la Ec 1. Este estudio se realizó por

sextuplicado, para las muestras de granos de cacao y chocolate con 61% y 73,5% de cacao.

$$\% R = \frac{[C]_{M+sp} - [C]_M}{[C]_{sp}} \times 100 \quad \text{Ec.1}$$

Siendo  $[C]_M$  la concentración determinada para la muestra no contaminada,  $[C]_{sp}$  la concentración del contaminante agregado previo a la digestión de la muestra y  $[C]_{M+sp}$  la concentración determinada en la muestra contaminada.

Adicionalmente, se determinaron las figuras de mérito de los métodos: la masa característica ( $m_0=0,0044/m$ , siendo  $m$  la pendiente de la curva de calibración en unidades de abs integrada por unidad de masa) el coeficiente de variación ( $CV = (sdv / \bar{X}) \times 100\%$ ), asociado a la precisión; y los límites de detección instrumental ( $LOD_i = 3s_B / m$ ) y de detección del método ( $LDO_m = LOD_i \times V_{enrase} / \text{masa} \times Fd$ ) asociado a la sensibilidad, donde  $sdv$  es la desviación estándar del valor del promedio;  $s_B$  es la desviación estándar del valor promedio de diez lecturas de un blanco y  $Fd$  es el factor de dilución de la muestra.

#### 4.3.6 Estudio ambiental de las muestras.

El resultado del contenido metálico determinado en las muestras fue comparado con las concentraciones establecidas en normas nacionales e internacionales.

Adicionalmente, se aplicó el Análisis de Componentes Principales (PCA) para establecer las posibles correlaciones entre las variables que explican la variabilidad de la data obtenida. En el caso de las muestras de chocolate comercial con 58,5 - 61% de cacao se exploró el posible efecto de la denominación de origen (DO) y la marca comercial sobre el contenido de los elementos y en el caso de los granos de cacao se estudió el posible efecto de la ubicación de la muestra respecto al Río Tuy. Dentro de

los análisis se incorporaron los resultados del pH de los suelos, donde se realizó la colecta de los granos, para establecer las posibles relaciones entre el contenido en los granos y la acidez del suelo.

Finalmente, se realizaron Pruebas de Contraste, ANOVA de una vía y prueba *t* de una cola, para determinar diferencias significativas en la concentración de metales de los chocolates comerciales entre denominaciones de origen y entre marcas comerciales.

## V RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Optimización de la temperatura de calcinación y atomización por ET AAS

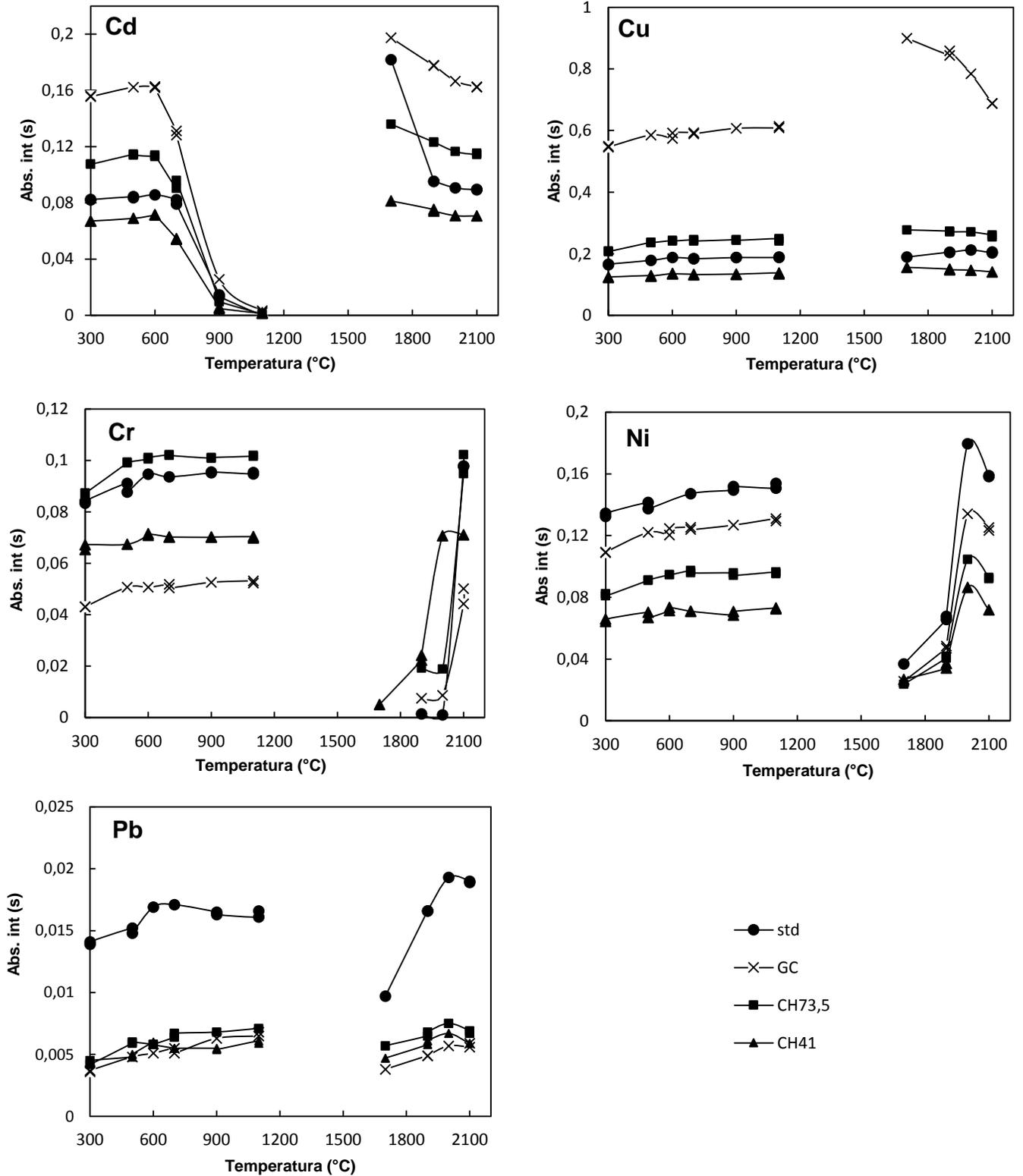
Se estudió el comportamiento de los analitos Cd, Cu, Cr, Ni y Pb durante las etapas de calcinado y atomización en ET AAS en una solución estándar, una solución de granos de cacao y dos soluciones de chocolate con porcentajes de cacao 73,5% y 41%. Todas las soluciones se llevaron a 0,1 % de HNO<sub>3</sub> y Tritón X-100 0,1%, y se empleó la mezcla de 3 µg de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 5 µg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificador químico.

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos y las tablas 20 y 21, las temperaturas óptimas de calcinado y atomizado, respectivamente, obtenidas para cada analito en cada tipo de solución.

Para la determinación multielemental se escogió como programa compromiso una temperatura de calcinado de 600 °C y una temperatura de atomizado de 2100 °C, esto en base a la estabilidad térmica del analito más volátil en el calcinado (Cd) y el más refractario en su atomización (Cr).

En general, las temperaturas óptimas de calcinado y atomización obtenidas para los elementos en las soluciones consideradas (Tabla 20 y Tabla 21) no presentaron diferencias importantes a excepción del Pb, para el cual se obtuvo en la etapa de calcinado una mayor estabilidad térmica en las soluciones de chocolates y granos (700 - 1000 °C) respecto a lo observado en la solución estándar (600 - 700°C), y para el Cu una menor estabilidad térmica en la solución de granos de cacao en relación a las otras soluciones (1700 °C Vs 1700 - 2100°C).

Estos resultados indicarían que no hay efectos importantes de la matriz y que el análisis de los elementos de todas las muestras podría realizarse simultáneamente, mediante una curva de calibración con estándar externo. Esto fue estudiado posteriormente obteniéndose resultados no satisfactorios.



**Figura 5.** Curvas de calcinado y atomizado para Cd, Cu, Cr, Ni y Pb en ET AAS

std, solución estándar; GC, solución de granos de cacao, Fd=4; CH73,5, solución de chocolate 73,5% de cacao, Fd=4; CH41, solución de chocolate 41% de cacao, Fd=2. Todas las soluciones se prepararon al 0,1% en HNO<sub>3</sub> y Tritón X-100 y se empleó como modificador químico 3 µg de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 5 µg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

**Tabla 20.** Temperaturas de calcinado óptimas en ET AAS

<b>Analito</b>	<b>Solución Estándar °C</b>	<b>Solución Granos de cacao °C</b>	<b>Solución Chocolate 73,5% °C</b>	<b>Solución Chocolate 41% °C</b>
Cd	600	600	600	600
Cu	600 - 1100	600 - 1100	600 - 1100	600 - 1100
Cr	600 - 1100	600 - 1100	600 - 1100	600 - 1100
Ni	900 - 1100	900 - 1100	800 - 1100	800 - 1100
Pb	600 - 700	700 - 1100	700 - 1100	700 - 1100

**Tabla 21.** Temperaturas de atomización óptimas en ET AAS

<b>Analito</b>	<b>Solución Estándar °C</b>	<b>Solución Granos de cacao °C</b>	<b>Solución Chocolate 73,5% °C</b>	<b>Solución Chocolate 41% °C</b>
Cd	1700	1700	1700	1700
Cu	1700 - 2100	1700	1700 - 2000	1700 - 2000
Cr	2100	2100	2100	2000
Ni	2000	2000	2000	2000
Pb	2000	2000	2000	2000

El programa térmico compromiso empleado para la detección simultánea de Cd, Cu, Cr, Ni y Pb mediante ET AAS se muestra en la Tabla 22. Como es un programa compromiso, alguno de los analitos podría experimentar una disminución de la sensibilidad, particularmente el Cd y Pb debido a la temperatura de atomización diferente de sus valores óptimos.

El programa térmico para el análisis de As no fue optimizado, pero de acuerdo a la literatura ((Perkin Elmer, 1989), su temperatura de calcinado (1300 °C) y de atomización (2100 °C) entran dentro de las consideradas en el

programa compromiso por lo que el As se determinó empleando este programa térmico.

**Tabla 22.** Programa térmico compromiso para la determinación multielemental de Cd, Cu, Cr, Ni y Pb en muestras de granos de cacao y chocolate.

Etapa	Temperatura °C	Tiempo de rampa s	Tiempo de permanencia s	Flujo de Ar mL min <sup>-1</sup>
Secado I	110	5	20	250
Secado II	130	5	20	250
Calcinado	600	10	20 <sup>a</sup> , 35 <sup>b</sup>	250
Enfriamiento	30	1	3	250
Atomización	2100	0	5	stop
Limpieza	2450	1	3	250

Modificador químico empleado 3 µg de Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 5 µg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

<sup>a</sup> tiempo empleado para granos de cacao

<sup>b</sup> tiempo empleado para chocolates

## 5.2 Figuras de mérito de las metodologías analíticas aplicadas

La determinación multielemental mediante ET AAS en las diferentes muestras fue realizada, inicialmente, aplicando la técnica de calibración externa. Sin embargo, los porcentajes de recuperación instrumental no fueron del todo satisfactorios, lo cual implica la presencia de efectos de matriz en algunas de las soluciones muestra que la exactitud del análisis.

En particular, el análisis de la solución de granos de cacao mediante curva de calibración externa presentó porcentajes de recuperación satisfactorios para todos los analitos. Por el contrario, en las soluciones de chocolate, se obtuvieron porcentajes de recuperación que difirieron con el porcentaje de cacao de cada muestra, por lo que se

decidió realizar el análisis de estas muestras aplicando una curva de adición de estándar para cada solución de chocolate con diferente porcentaje de cacao. Este efecto matriz observado en las muestras de chocolate, no fue observado en las muestras de granos de cacao debido a que la solución de los granos pudieron ser diluidos más dado a su mayor contenido de elementos.

En todas las muestras, la determinación del Zn se realizó mediante FAAS aplicando curva de calibración con estándar externo.

Los resultados de las figuras de mérito obtenidos para las metodologías aplicadas al análisis de los granos se muestran en la Tabla 23 y los obtenidos en el análisis de chocolate 73,5% de cacao en la Tabla 24. Dado que el valor del LOD<sub>m</sub> depende de la sensibilidad analítica y el factor de dilución, en las tabla 30 y 31 del Apéndice 1 se muestran los resultados obtenidos para todos los chocolates analizados.

**Tabla 23.** Figuras de mérito del análisis por curva de calibración externa <sup>a</sup>

Elemento <sup>b</sup>	<i>m</i> <sub>o</sub> pg	LOD <sub>i</sub> µg L <sup>-1</sup>	LOQ µg L <sup>-1</sup>	LOD <sub>m</sub> mg kg <sup>-1</sup>	%R	LOD <sub>i</sub> reportado <sup>c</sup> µg L <sup>-1</sup>	LOD <sub>m</sub> Reportado <sup>c</sup> mg kg <sup>-1</sup>
<b>Cd</b>	3,3	0,04	0,1	0,0003	100	0,004	0,0001
<b>Cu</b>	28	0,9	3,0	0,005	95	0,21	0,005
<b>Cr</b>	9	0,4	1,2	0,002	103	0,04	0,001
<b>Ni</b>	38	2,1	7,1	0,013	112	0,13	0,003
<b>Pb</b>	68	1,5	4,9	0,009	96	0,029	0,0007
<b>Zn</b>	-	0,12 <sup>d</sup>	0,4 <sup>d</sup>	6,0	-	0,004 <sup>d</sup>	0,09

<sup>a</sup> Técnica cuantitativa aplicada al análisis de todos los elementos en granos y para Zn en chocolate

<sup>b</sup> Cd, Cu, Cr, Ni y Pb analizados por ET AAS con Fd= 8 y Zn analizado por FAAS con Fd=1.

<sup>c</sup> Bertoldi et al., 2016, determinación mediante ICP MS

<sup>d</sup> unidades en mg L<sup>-1</sup>

**Tabla 24.** Figuras de mérito del análisis por curva de adición de estándar <sup>a</sup>

<b>Elemento</b>	<b><math>m_0</math></b> pg	<b>LOD<sub>i</sub></b> µg L <sup>-1</sup>	<b>LOQ</b> µg L <sup>-1</sup>	<b>LOD<sub>m</sub></b> mg kg <sup>-1</sup>	<b>%R</b> <sup>b</sup>	<b>Técnica analítica</b>
<b>As</b>	58	0,63	2,1	0,059	--	ET AAS
<b>Cd</b>	4,5	0,07	0,2	0,0009	112	ET AAS
<b>Cu</b>	30	0,7	2,2	0,008	106	ET AAS
<b>Cr</b>	9	0,2	0,8	0,003	113	ET AAS
<b>Ni</b>	38	1,9	6,5	0,023	103	ET AAS
<b>Pb</b>	72	0,86	2,9	0,010	117	ET AAS

<sup>a</sup> Técnica cuantitativa aplicada al análisis de As, Cd, Cu, Cr, Ni y Pb en chocolate de 73,5% cacao y As en granos de cacao.

<sup>b</sup> Cd, Cu, Cr, Ni, Pb con Fd=4 y As con Fd= 2

Las figuras de mérito determinadas asociadas a la sensibilidad fueron la pendiente de la curva de calibración ( $m$ ) (Tabla 30 del Apéndice 1), la masa característica ( $m_0$ ) y los límites de detección instrumental (LOD<sub>i</sub>) y metodológico (LOD<sub>m</sub>).

Los valores de  $m_0$  obtenidos se encuentran dentro del intervalo para el análisis por ET AAS (Perkin Elmer, 1989). Los valores obtenidos para el LOD<sub>i</sub> fueron superiores en valor numérico, para todos los elementos, mientras que los LOD<sub>m</sub> fueron comparables para Cd, Cu y Cr y superiores para Ni, Pb y Zn respecto a los señalados por Bertoldi, et al. (2016), quienes emplearon ICP MS (Tabla 23) para analizar granos de cacao y chocolate. Esta mejora en la sensibilidad se debe a la metodología e intervalo de concentración aplicados en el análisis simultáneo mediante ET AAS. En el caso del Zn, la variación en sensibilidad está relacionada con la importante diferencia entre la sensibilidad entre las técnicas FAAS vs ICP MS.

Los límites de detección instrumental y metodológico obtenidos para los diferentes analitos, en el análisis de las muestras de granos de cacao y chocolate de 73,5% de cacao, fueron comparables o se encuentran en el mismo orden, a pesar de que se determinaron aplicando diferentes técnicas de calibración, lo cual se relaciona con el factor de dilución aplicado a estas muestras (Fd=4 para la solución de chocolate 73,5% y Fd=8 para la solución de granos de cacao). Ambas muestras, con el factor de dilución aplicado, presentan una matriz comparable y similar a la de la solución estándar. En el

caso de los otros chocolates, los factores de dilución difirieron entre muestras y fueron inferiores a 4 (Apéndice 1, Tabla 31).

La exactitud de los análisis se evaluó mediante el porcentaje de recuperación (%R) dada la no disponibilidad de muestras de referencia certificadas apropiadas. Para ello, las muestras, previo a su digestión y análisis químico, fueron contaminadas con cantidades conocidas de cada elemento. El estudio se realizó con las muestras de granos y de chocolate 73,5% y 61% de cacao, obteniéndose porcentajes de recuperación (95 - 117 %) que garantizan la exactitud de las metodologías de análisis aplicadas.

En particular, los porcentajes de recuperación obtenidos (tablas 23 y 24 y en Apéndice 1, tablas 32 y 33 ) para Cd, Cu, Cr, Ni y Pb en las muestras de granos y chocolate 73,5% de cacao se encontraron dentro del intervalo generalmente aceptado del 85 - 110%. En la muestra de chocolate 61 % de cacao, los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre el 97 - 118 %, excepto para el plomo para el cual se obtuvo un 74% (Apéndice 1, Tabla 34). Este porcentaje de recuperación pudiera considerarse bajo. Sin embargo, se encuentra dentro del intervalo empleado por Bertoldi, et al. (2016) en el estudio de recuperación en muestras de granos y chocolate analizados mediante ICP MS (70 - 115 %).

La precisión de los resultados está determinada por la sumatoria de las variabilidades asociadas a la medida instrumental, el efecto de la matriz, la metodología del análisis, y la homogeneidad de la muestra. El aporte de cada uno de estos factores se estimó en base a los resultados del estudio de recuperación (Tabla 25). La variabilidad instrumental se asoció al coeficiente de variación de la determinación de los elementos en el estándar acuoso ( $CV_{Std}$ ); la variabilidad que aporta la matriz se asoció a la obtenida en el análisis de las muestras de grano por CCE y para chocolate a la correspondiente a la medida de muestra+Std en la CAE ( $CV_{Std + M}$ ); y la variabilidad que aporta la metodología de análisis y la homogeneidad de la muestra se asoció a la variabilidad de

la concentración promedio obtenida en la determinación con seis réplicas independientes de una misma muestra ( $CV_{6M}$ ).

En la Tabla 25 se observa que la variabilidad de la determinación en las curvas de calibración de las muestras (Std, 2 - 9 %) es ligeramente superior a la del estándar acuoso (1 - 5 %), lo que implica que la matriz de las diferentes muestras aporta a la variabilidad de la medida; esta variabilidad aumento, en los estudios de recuperación en la determinación de las seis réplicas 6 de muestra (3 - 15 %), lo cual indica que la metodología y homogeneidad de las muestras también afecta la precisión del análisis. Teniendo en cuenta que el intervalo de la variabilidad en las tres muestras (granos de cacao y chocolate 73,5 % y 61 % de cacao) es comparable, pudiera deducirse que dicha variabilidad es aportada por la metodología del tratamiento de la muestra (pesada, digestión, trasvase y dilución) más que por la homogeneidad de la muestra.

Por otra parte, los coeficientes de variación obtenidos para el plomo fueron mayores al intervalo considerado como variabilidad instrumental, y fueron asociados a las bajas concentraciones de las curvas de calibración que fueron empleadas con el objetivo de determinar este elemento en las muestras, donde se encontró en muchos casos cercano al límite de cuantificación.

**Tabla 25.** Coeficientes de variación del análisis en diferentes tipos de muestras

Elemento	Curvas de calibración			Estudios de recuperación		
	Std	CH 73,5	CH 61	GC	CH 73,5	CH 61
	$CV_{Std}$ %	$CV_{Std+M}$ %	$CV_{Std+M}$ %	$CV_{6M}$ %	$CV_{6M}$ %	$CV_{6M}$ %
Cd	1	4	2	3	5	3
Cu	2	4	2	6	8	3
Cr	5	4	6	-	8	4
Ni	1	2	4	10	15	9
Pb	<b>12</b>	9	4	14	5	<b>25</b>

CCE curva de calibración externa; CAE: Curva de adición estándar; Std: solución estándar acuoso; CH 73,5: chocolate con 73,5% de cacao; CH 61: chocolate con 61% de cacao;  $CV_{Std}$ : variabilidad instrumental;  $CV_M$  y  $CV_{Std+M}$ : variabilidad de la matriz;  $CV_{6M}$ : variabilidad de la metodología de análisis y homogeneidad de la muestra

### 5.3 Concentración de metales pesados en chocolates

Se analizaron 14 muestras de chocolate comercial que fueron compradas en comercios locales y fueron clasificadas tomando en cuenta su denominación de origen (DO): Carenero Superior (1), Rio Caribe (2) y Sur del Lago (3); su marca comercial: A, B, y C; y su porcentaje de cacao: entre 34 % - 73,5 %.

En la Tabla 26 se presentan las concentraciones obtenidas para los elementos Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn. El contenido de As en los chocolates estuvo por debajo del límite de detección en todas las muestras, y la concentración de Cd y Cr en el chocolate de 34 % de cacao estuvo por debajo del límite de detección. En la Figura 6 se muestra la representación gráfica del contenido de metales pesados en función del porcentaje de cacao presente en las muestras de chocolates analizadas, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el nivel máximo permitido en normativas nacionales e internacionales vigentes.

En la Figura 6 se observa que el contenido de Cd de las muestras  $\geq 70$  % de cacao de la denominación de origen 1 (Carenero Superior) es mayor al contenido máximo establecido por el reglamento de la UE N° 488/2014 ( $0,80 \text{ mg kg}^{-1}$  para chocolates con un contenido de materia seca total de  $\geq 50\%$  cacao), y es comparable al obtenido en chocolate venezolano 100 % de cacao por Bertoldi et al., 2016. Los chocolates entre 58,5 - 61% de cacao presentan concentraciones de Cd dentro de las normas. El chocolate 41% de cacao presentó una concentración inferior al contenido máximo permitido por el reglamento UE N° 488/2014 y MERCOSUR N° 12/11 ( $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$ ). El chocolate 34% de cacao es un chocolate blanco con mayor contenido de manteca y presentó una concentración baja de éste elemento, lo cual coincide con el estudio realizado por Mounicou et al. 2003 (Tabla 11) donde reportó que el Cd queda retenido en el polvo de cacao y no en la manteca.

**Tabla 26.** Concentración de metales pesados en chocolates, en mg kg<sup>-1</sup>

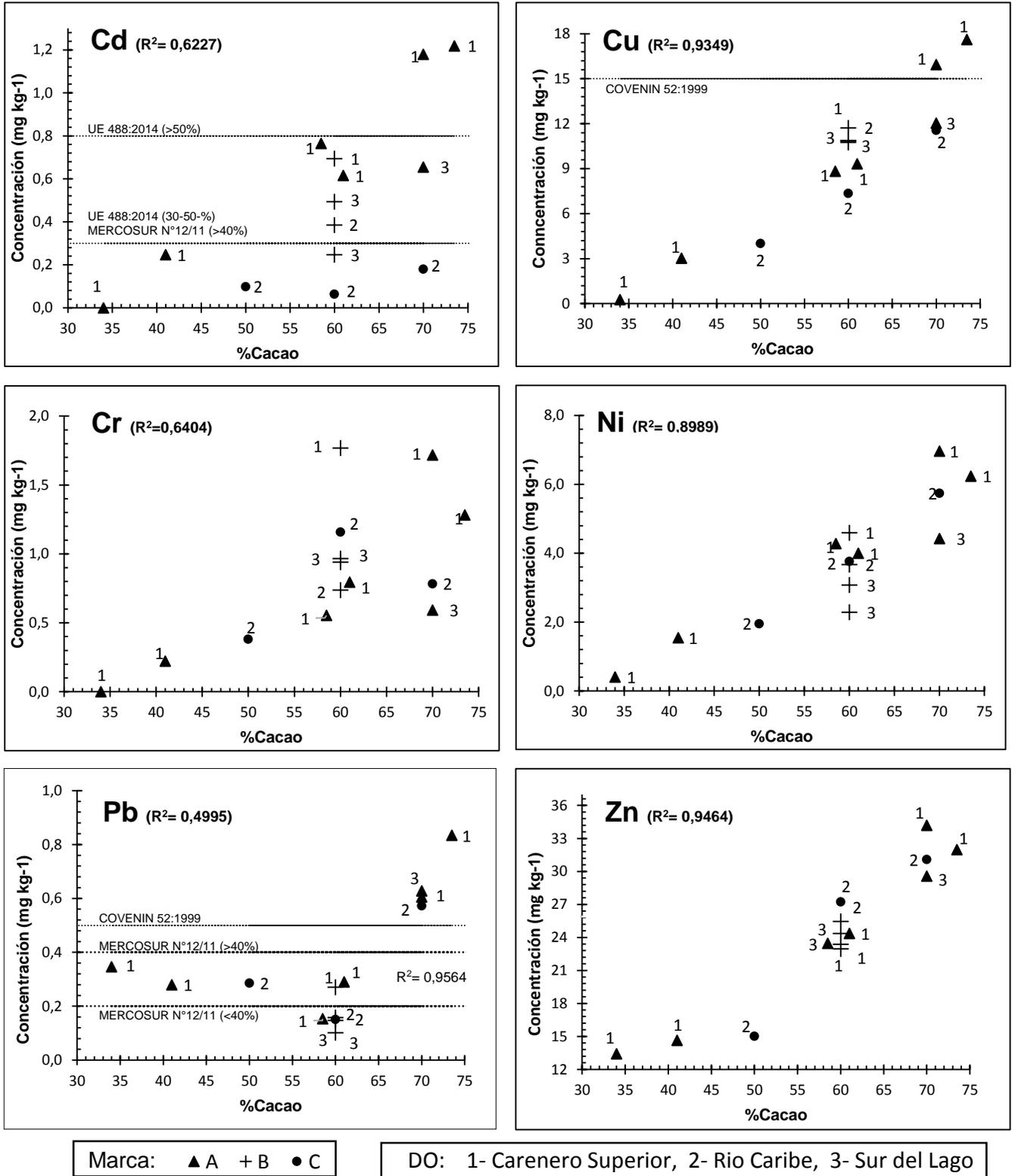
	%Cacao	DO	Marca	Cd	Cu	Cr	Ni	Pb	Zn
<b>Este Trabajo</b>									
Venezuela	34	1	A	< LOD	0,3 ± 0,1 (33)	< LOD	0,4 ± 0,1 (37)	0,35 ± 0,02 (6)	13,4 ± 0,7 (5)
	41	1	A	0,25 ± 0,01 (4)	3,0 ± 0,1 (3)	0,22 ± 0,04 (16)	1,5 ± 0,2 (13)	0,28 ± 0,1 (52)	14,6 ± 0,2 (1)
	50	2	C	0,10 ± 0,01 (10)	4,0 ± 0,2 (5)	0,38 ± 0,02 (5)	2,0 ± 0,1 (5)	0,29 ± 0,08 (29)	15 ± 1 (7)
	58,5	1	A	0,77 ± 0,02 (2)	8,8 ± 0,2 (3)	0,55 ± 0,01 (2)	4,3 ± 0,1 (3)	0,15 ± 0,01 (7)	23,5 ± 0,9 (4)
	60	1	B	0,69 ± 0,01 (1)	11,7 ± 0,1 (1)	1,77 ± 0,2 (12)	4,6 ± 0,3 (7)	0,27 ± 0,01 (5)	23,0 ± 0,6 (2)
	60	2	C	0,06 ± 0,01 (3)	7,3 ± 0,3 (4)	1,16 ± 0,1 (7)	3,8 ± 0,1 (4)	0,15 ± 0,01 (9)	27 ± 1 (4)
	60	2	B	0,38 ± 0,02 (4)	10,9 ± 0,2 (2)	0,7 ± 0,1 (11)	3,7 ± 0,1 (3)	0,16 ± 0,07 (46)	25,5 ± 0,2 (1)
	60	3	B	0,23 ± 0,01 (4)	10,8 ± 0,4 (3)	0,9 ± 0,1 (8)	2,3 ± 0,1 (3)	0,15 ± 0,08 (56)	24 ± 1 (6)
	60	3 <sup>a</sup>	B	0,49 ± 0,02 (4)	10,8 ± 0,1 (0,9)	1,0 ± 0,1 (8)	3,1 ± 0,6 (19)	0,10 ± 0,01 (5)	23,4 ± 0,8 (3)
	61	1	A	0,62 ± 0,02 (3)	9,3 ± 0,3 (3)	0,79 ± 0,03 (4)	4,0 ± 0,4 (9)	0,29 ± 0,07 (25)	24 ± 2 (17)
	70	1	A	1,18 ± 0,09 (8)	15,9 ± 0,1 (1)	1,7 ± 0,03 (2)	7,0 ± 0,5 (7)	0,61 ± 0,1 (17)	34,2 ± 0,3 (1)
	70	2	C	0,18 ± 0,01 (7)	11,6 ± 0,1 (1)	0,78 ± 0,05 (7)	5,7 ± 0,1 (2)	0,57 ± 0,03 (4)	31 ± 3 (9)
	70	3	A	0,66 ± 0,04 (6)	12,0 ± 0,1 (0,8)	0,59 ± 0,02 (5)	4,4 ± 0,2 (5)	0,63 ± 0,06 (9)	29,6 ± 0,4 (1)
	73,5	1	A	1,22 ± 0,06 (5)	18 ± 1 (8)	1,3 ± 0,1 (8)	6,2 ± 0,9 (15)	0,83 ± 0,04 (5)	32 ± 2 (6)
<b>Bertoldi et al., 2016</b>									
Venezuela	71	-	-	0,82				0,08	
	72	-	-	0,84					
	100	-	-	1,28					
Ecuador	66	-	-	0,33					
	100	-	-	0,44					
Perú	100	-	-	0,87					
Suramérica (n=8) <sup>b</sup>	62-100			0,615 ± 0,398	13,3 ± 4,7	1,7 ± 2,0	4,7 ± 1,8	0,0235 ± 0,025	25,9 ± 10,2
<b>Normativas</b>									
UE N° 488/2014	≥ 30 < 50			0,3					
	≥ 50			0,8					
MERCOSUR N° 12/11	< 40			0,20				0,20	
	> 40			0,30				0,40	
COVENIN 52:1999	-				15			0,5	

DO: denominación de origen; 1: Carenero Superior; 2: Río Caribe; 3: Sur del Lago

Promedio ± desviación estándar; coeficiente de varianza en paréntesis

<sup>a</sup> chocolate de cobertura

<sup>b</sup> Brasil (1,62%), Ecuador (2, 66% y 100%), Perú (1, 100%) y Venezuela (4, 68%, 72%, 72%, 100%)



**Figura 6.** Contenido de metales pesados en chocolate comercial venezolano de diferentes denominaciones de origen (DO), marcas comerciales, y valores de normativas.

El contenido de Cu en los chocolates con 70 % y 73,5 % de cacao y denominación de origen 1 (Carenero Superior) fue superior al límite máximo establecido por la norma venezolana COVENIN 52: 1999 de  $15,0 \text{ mg kg}^{-1}$  y al reportado por Bertoldi et al., 2016 en la región suramericana.

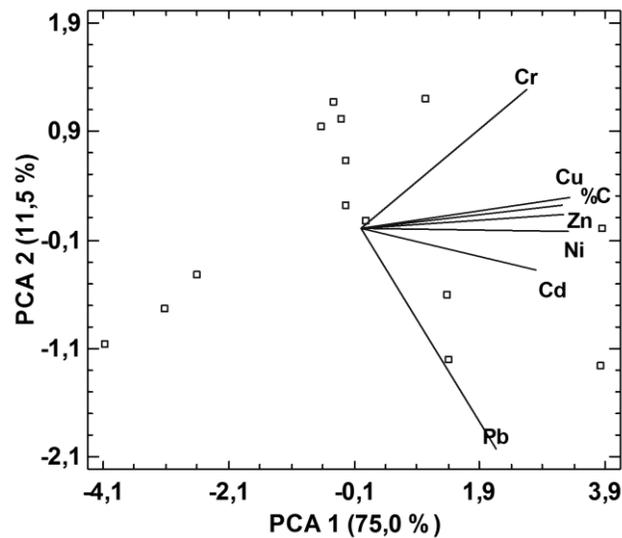
En el caso del Pb, los chocolates con un porcentaje de cacao  $\geq 70 \%$  presentaron una concentración superior al límite máximo establecido por la norma venezolana COVENIN 52: 1999, de  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  y MERCOSUR N° 12/11 de  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ; y la concentración del chocolate de 34% de cacao superó el límite máximo establecido por MERCOSUR N° 12/11 de  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ . Adicionalmente, para los chocolates con  $< 58,5 \%$  de cacao se obtuvo una relación negativa entre el contenido del Pb y el porcentaje de cacao que puede ser debido al aporte de los otros componentes agregados durante la producción de chocolates; uno de estos componentes puede ser la manteca, en la cual, de acuerdo a Mounicou et al. 2003 se concentran especies hidrofóbicas de Pb.

Para los elementos Cr, Ni y Zn no existe una norma que establezca los niveles máximos permitidos para los derivados del cacao. En comparación a los resultados por Bertoldi et al., 2016 en chocolate suramericano, las concentraciones obtenidas para el Zn fueron mayores a  $25,9 \text{ mg kg}^{-1}$  para un chocolate de 60% y para todos los chocolates con un porcentaje  $\geq 70 \%$  cacao. En el caso del Ni, se obtuvieron concentraciones superiores ( $> 4,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en los chocolates de 70% de cacao. Y en el caso del Cr se obtuvieron valores superiores ( $> 1,7 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en dos chocolates, uno de 70 % y otro de 60 % cacao.

Para todos los elementos Cd, Cu, Cr, Ni y Zn se observó un incremento de la concentración con el porcentaje de cacao en el chocolate, tendencia reportada por Bertoldi et al., 2016. El caso del Pb se observó la misma tendencia en los chocolates con un porcentaje de cacao  $\geq 58,5 \%$ .

En el análisis de componentes principales (PCA) realizado se determinaron dos componentes principales que explican el 86,5 % de la variabilidad de los datos

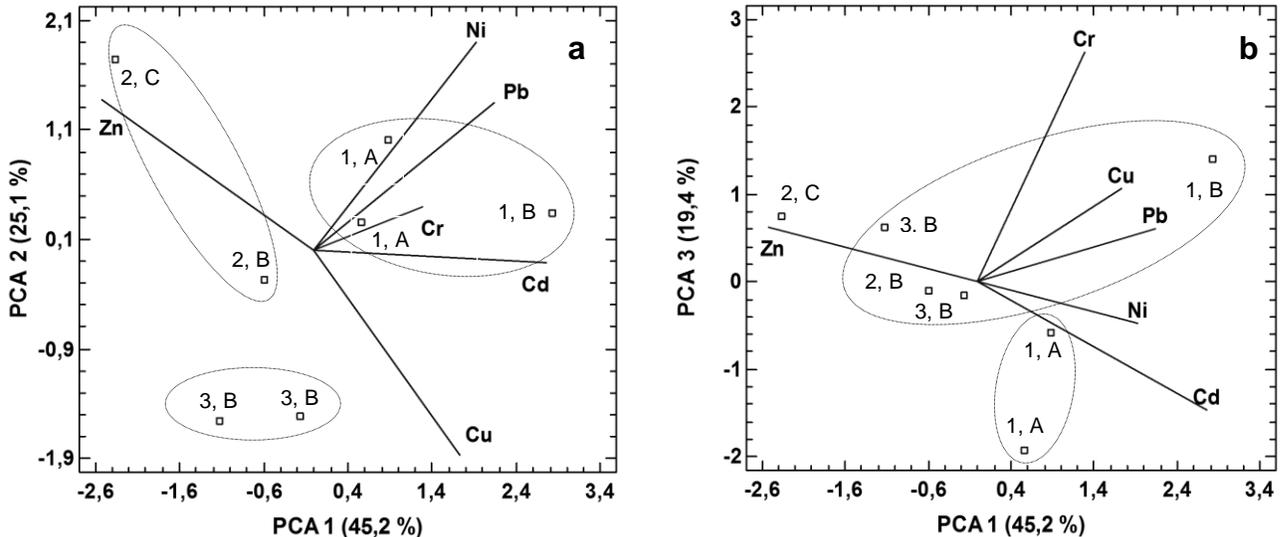
(Apéndice A.2.1). La Figura 7 presenta la bigráfica del PCA1 Vs PCA 2, donde se observa la correlación positiva obtenida entre la concentración de los elementos y el porcentaje de cacao (%C) ( $P \leq 0,05$  para Cd, Cu, Cr y Zn y  $P \leq 0,07$  para Pb). Esto muestra que la concentración de estos metales en el chocolate depende fundamentalmente del porcentaje de cacao.



**Figura 7.** Bigráfica PCA en chocolate comercial venezolano (n=14)

Para obtener mayor información se eliminó la variable fundamental (%C) seleccionándose los chocolates con porcentaje de cacao comparables (58,5 - 61 %). El estudio de PCA obtenido en estos chocolates presentó tres componentes principales que explican el 89,7 % de la variabilidad de la data (Apéndice A.2.2). En las bigráficas obtenidas (Figura 8) destaca el agrupamiento de los puntos experimentales de la DO 1 asociados a los elementos Cd, Ni y Pb que se encuentran correlacionados entre sí, mientras que los de la DO 2 se reúnen y se asocian al Zn y los de la DO 3 se alejan de todos los elementos (Figura 8. a). En la bigráfica de la Figura 8.b se observa la asociación de los puntos experimentales de la marca A con el Cd, los de la marca C en dirección

opuesta al Cd y asociados al Zn y los de la marca B en oposición a todos los elementos, excepto 1 punto (1, B)



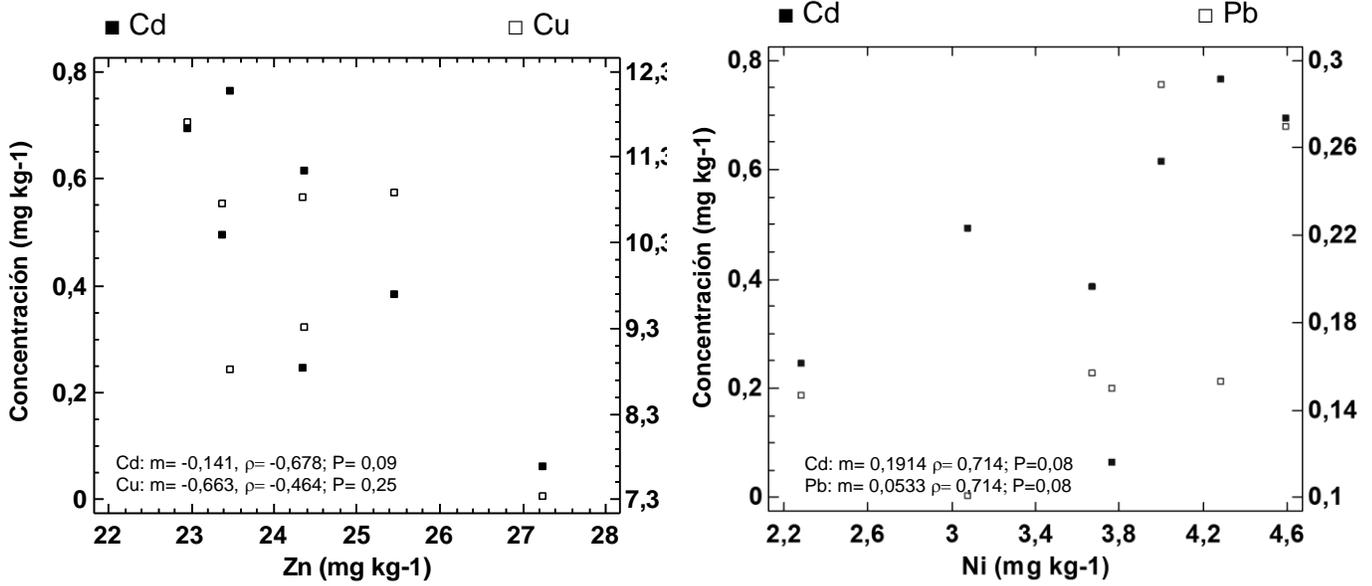
DO: 1- Carenero Superior, 2- Río Caribe, 3- Sur del Lago  
 Marca: A, B y C

**Figura 8.** Bigráfica del PCA en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n= 7)

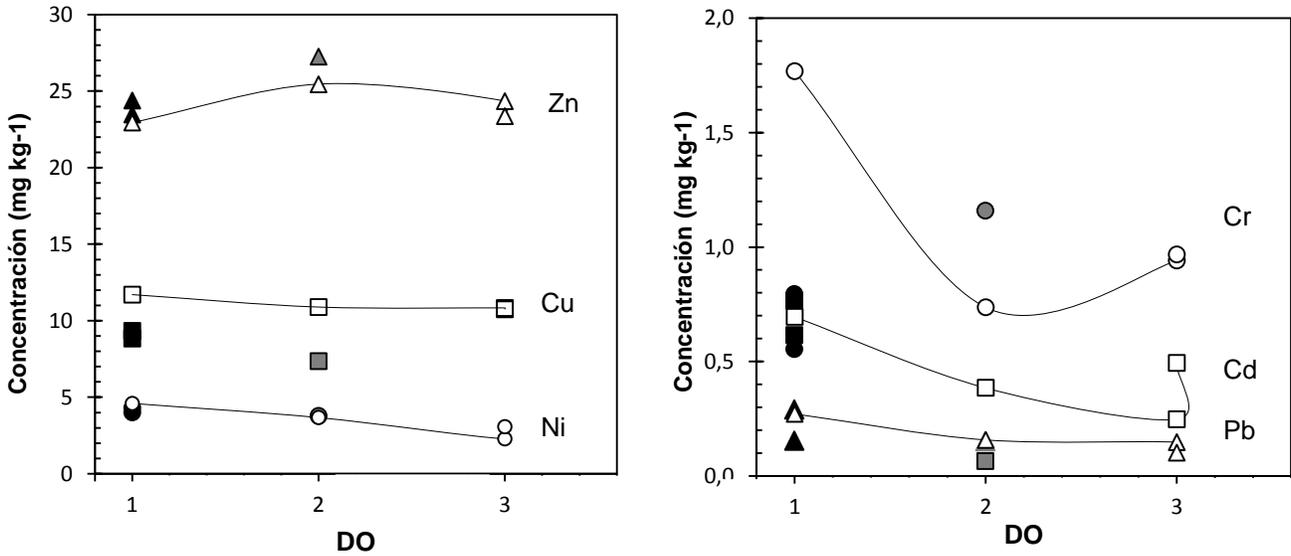
Estos resultados señalan el efecto de la procedencia geográfica del fruto de cacao (denominación de origen) y la fabricación en el contenido de los elementos en los chocolates, además del producido por el porcentaje de cacao.

Adicionalmente, en este estudio de PCA se determinó la correlación negativa entre los elementos Cd y Cu con el Zn y la correlación positiva entre el Cd y Pb con el Ni (Figura 9, Apéndice A.2.2, Tabla 42), que están asociados a las diferencias entre las concentraciones entre DO, principalmente.

En la Figura 10 se muestra en dos gráficas la concentración de Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn en función de la denominación de origen de los chocolates con 58,5 - 61 % de cacao (n=7), donde se observan las diferencias en la concentración de algunos elementos entre las DO y entre marcas comerciales dentro de una misma DO.



**Figura 9.** Correlación entre elementos en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n= 7)



DO: 1- Carenero Superior, 2- Río Caribe, 3- Sur del Lago  
 Marca: A: símbolo en negro; B: Símbolo en blanco; C: símbolo en gris

**Figura 10.** Contenido de metales pesados en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao denominaciones de origen (DO) y marcas comerciales

Se aplicaron pruebas estadísticas (Levene, ANOVA de una vía y Prueba de múltiples rangos) para determinar diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la concentración de los elementos entre denominaciones de origen (DO). Los resultados (Tabla 27 y en Tabla 43 del Apéndice 3) indicaron que la DO 1 (Carenero Superior) presentó la mayor concentración de Cd, Ni y la menor concentración en Zn, mientras que la DO 2 (Rio Caribe) presentó la mayor concentración de Zn y Ni, y la DO 3 (Sur del Lago) presentó la menor concentración de Cd, Ni y Zn. La concentración de Ni en las DO 1 y 2 no presentaron diferencias significativas.

**Tabla 27.** Diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre DO de acuerdo a su concentración de elementos en chocolates 58,5-61 % de cacao (n=7)

Denominación de Origen	Concentración	
	Mayor	Menor
1 Carenero Superior	Cd, Ni	Zn
2 Rio Caribe	Zn, Ni	Cd
3 Sur del Lago		Cd, Ni, Zn

No se determinaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ ) en la concentración de Cu, Cr y Pb entre DO. Sin embargo, en el caso del Cr la dispersión elevada de concentraciones entre marcas, dentro de una misma denominación de origen, representa una limitación para la prueba.

También se realizaron pruebas de significancia para determinar, dentro de cada denominación de origen, diferencias en la concentración de los elementos entre marcas de chocolates. La prueba se realizó para este grupo de chocolates con concentraciones comparables de cacao (58,5 - 61 %). En la DO 1 se compararon las marcas A y B, en la DO 2 se comparó las marcas B y C. En la DO 3 no se realizó la prueba por no disponer de muestras de diferente marca en concentración de cacao de 58,5 a 61%. En la Tabla 28 se muestran los casos que resultaron con diferencias significativas ( $P \leq 0,10$ ), y en el Apéndice 3, Tabla 44 todos los resultados.

**Tabla 28.** Pruebas de contraste de la concentración de metales entre marcas para chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n=7)<sup>a</sup>

Elemento	DO	Prueba F			Prueba t (dos colas)				Diferencias entre Marcas
		F <sub>ex</sub>	F <sub>teo</sub>	GL <sup>b</sup>	s	t <sub>exp</sub>	t <sub>crit</sub>	GL	
<b>Cd</b>	1	8,9	39,3	5,2	0,018	-6,31	1,89	7	B (60) > A (61)
		7,4	38,5	1, 2	0,012	6,32	2,35	3	A (58,5) > B (60)
	2	68,0	647,8	1,1	0,011	28,16	2,92	2	B (60) > C
<b>Cu</b>	1	6,2	39,3	5,2	0,226	-14,92	1,89	7	B (60) > A(61)
		5,4	38,5	1, 2	0,163	-19,30	2,35	3	B (60) > A(58,5)
	2	2,4	647,8	1,1	0,255	-13,85	2,92	2	B (60) > C
<b>Cr</b>	1	59963,0	799,5	2,1		9,73	2,92	2	B (60) > A(58,5)
	2	1,0	647,8	1,1	0,081	5,21	2,92	2	C > B (60)
<b>Ni</b>	1	1,2	39,3	5,2	0,344	-2,44	1,89	7	B (60) > A(61)
<b>Pb</b>	1	1,6	799,5	2,1	0,013	9,77	2,35	3	B (60) > A(58,5)

<sup>a</sup> P $\geq$ 0,05 para todos los casos, excepto para Ni con P $\geq$ 0,10; <sup>b</sup> GL: grados de libertad del numerador y denominador en paréntesis el porcentaje de cacao

Los resultados mostraron diferencias significativas entre marcas comerciales para todos los elementos, excepto el Zn. La marca B presentó, en la mayoría de los chocolates, concentraciones mayores que las otras dos marcas (A y C). Las marcas A y C no se compararon entre si debido a que no se contó con chocolates de estas marcas que fueran de la misma DO y porcentaje de cacao.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de los elementos en los chocolates depende del contenido de cacao, pero existen diferencias sustantivas entre denominaciones de origen, es decir, entre procedencias geográficas del fruto de cacao. Adicionalmente, dentro de la DO se presentan diferencias entre marcas que refiere a efectos de la manufactura y de los agregados sobre el contenido de los elementos en los chocolates. En el caso del Pb, los agregados al chocolate  $\leq$  58,5 % cacao pueden aportar concentraciones adicionales que deben ser consideradas.

Por otra parte, los chocolates venezolanos de la denominación Carenero Superior  $\geq 70$  % de cacao presentan concentraciones de Cd y Cu superiores a la establecidas en las normas UE 488:2014 y COVENIN 52:1999, y para el Pb en todas las denominaciones de origen se presentan concentraciones superiores a la indicada en la norma COVENIN 52:1999.

#### **5.4 Concentración de metales en granos de cacao**

Las concentraciones de metales pesados obtenidas en las muestras analizadas (n=34) se muestran en la Tabla 29 y en el Apéndice 4. Hay que destacar que algunas muestras presentaron concentraciones por debajo del límite de detección, específicamente 16 muestras en el caso del Cr y 1 muestra en el caso del Pb. La concentración del arsénico en todas las muestras se encontró por debajo del límite de detección.

En la Figura 11, se presenta el diagrama de cajas y bigotes obtenido para todos los elementos analizados en las muestras de granos. El orden de concentración obtenido para los elementos fue  $Zn > Cu > Ni > Pb > Cd > Cr$ , donde el Zn y el Cu son los elementos de mayor concentración, lo cual está relacionado con su carácter esencial para las plantas.

La concentración de Cd en todas las muestras de granos superó la concentración máxima recomendada por la norma COVENIN 50:2018, y el 79 % de las muestras superó el límite establecido por UE 488/2014. La concentración obtenida para el Cd fue comparable a la de granos de cacao no fermentados y sin cáscara reportada por Lanza et al. 2016 en la localidad de Zulia (Venezuela). Los granos analizados en este trabajo tuvieron una concentración máxima comparable a la reportada por Arévalo et al. 2016 en granos no fermentados con cáscara, de la localidad de Tumbes, Perú, y un contenido superior a los granos de procedencia africana reportados por Takarama et al. 2015.

**Tabla 29.** Concentraciones obtenidas en granos de cacao analizados y reportados en la literatura en mg kg<sup>-1</sup>

	Localidad	n	Cd	Cu	Cr	Ni	Pb	Zn
<b>Este trabajo<sup>a</sup></b>	Venezuela	34	0,4 - 2,0	12 - 41	0,1 - 0,5	1 - 14	0,3 - 3,2	36 - 56
	Miranda		0,9 ± 0,4 (42)	26 ± 6 (25)	0,3 ± 0,1 (48)	7 ± 3 (41)	1,3 ± 0,6 (50)	46 ± 5 (11)
<b>Otros trabajos</b>								
Lanza et al., 2016 <sup>a</sup>	Venezuela	1					-	-
	Zulia		1,9 - 2,1	16,4 - 21,4	0,34-0,44	4,37		
Chávez et al., 2015	Ecuador	19	0,37					
Arévalo et al., 2017 <sup>b</sup>	Perú	10						
	Amazonas			30,4 ± 1,4	4,8 ± 1,4			
	Cusco		0,17 ± 0,4	18,7 ± 3,9			3,78 ± 0,39	
	Huanuco					9,2 ± 2,0		
	Tumbes		1,8 ± 0,4			3,5 ± 2,0		
Bertoldi et al., 2016 <sup>c</sup>	Suramérica <sup>d</sup>	14	1,4 ± 1,1	20,8 ± 3,0	1,4 ± 1,0	6,5 ± 2,0	0,07 ± 0,03	47,4 ± 3,5
Gramlich et al., 2017 <sup>a</sup>	Honduras	55	1,1 ± 0,2					
Takrama et al., 2015 <sup>c</sup>	Ghana	1	0,25 - 0,3					
<b>Normativas</b>								
UE N° 488/2014			0,6					
CODEX STAN 141-1983			-	30	-	-	2,0	-
COVENIN 50:2018			0,3	15	-	-	0,5	-

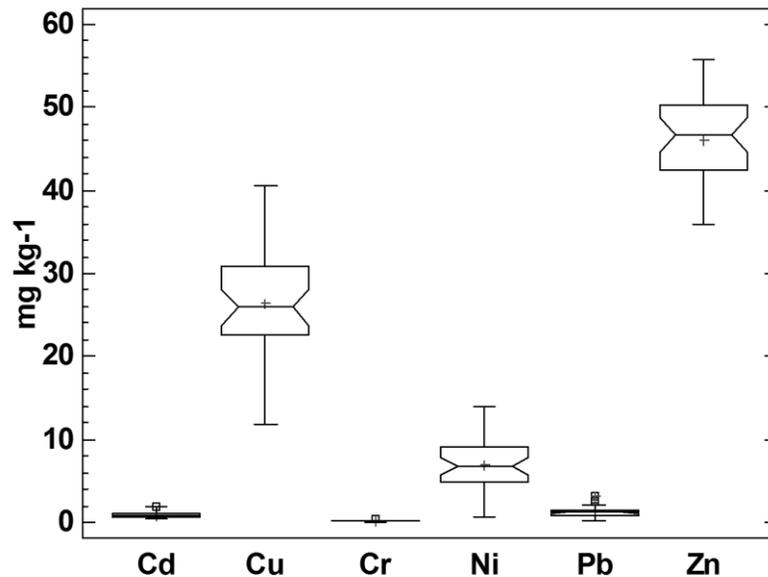
Intervalo de concentración, promedio ± desviación estándar y coeficiente de variación

Característica del Grano: <sup>a</sup> No fermentado sin cáscara; <sup>b</sup> No fermentado con cáscara; <sup>c</sup> Fermentados con cáscara

<sup>d</sup> Brasil (1), Ecuador (2), Perú (7) y Venezuela (4). El autor no proporciona resultado por país.

El 82% de los granos analizados en este trabajo superaron la concentración máxima de Cu recomendada en la norma COVENIN 50:2018; y un 35 % de las muestras superó el límite establecido por el CODEX-STAN 141-1983; el 76 % de las muestras también superó la concentración reportada por Lanza et al. 2016 para la localidad de Zulia (Venezuela), y fue comparable a la concentración reportada por Arévalo et al. 2016 en Amazonas, Perú.

El contenido de Pb en el 91% de la muestras fue superior al recomendado en la norma COVENIN 50: 2018; y el 15% superó el límite establecido por el CODEX-STAN 141-1983; sin embargo, la concentración fue menor a la reportada en la localidad de Perú por Arévalo et al. 2016.



**Figura 11.** Diagrama de caja y bigotes para metales en granos de cacao

Para los elementos Cr, Ni y Zn, no existe una norma que establezca los niveles máximos permitidos en los granos de cacao, sin embargo, existe información sobre la concentración de estos elementos en granos de cacao en diferentes localidades. En el caso del Cr, el 89% de las muestras analizadas presentó una concentración comparable a la reportada por Lanza et al. 2016 en granos venezolanos del estado Zulia (Venezuela); la concentración obtenida para el Cr fue menor a la reportada por Arévalo et al. 2016 en Perú y por Bertoldi, et al. 2016 en Suramérica. En el caso del Ni, el 82% de las muestras analizadas presentaron una concentración superior a la reportada por Lanza et al. 2016 en granos venezolanos, mientras que el 62% de las muestras presentaron una concentración mayor a la reportada por Bertoldi, et al. 2016 en su estudio de granos de cacao de Suramérica. El contenido de Zn en el 47% de las muestras presentará una concentración mayor a la reportada por Bertoldi, et al. 2016 para Suramérica.

Al realizar el análisis de componentes principales (PCA) a toda la data de granos de cacao se determinaron 4 componentes principales que explican el 70,3 % de la

variabilidad de los datos (Apéndice A.5.1). En la Figura 12, la bigráfica PCA 2 Vs PCA 1 presenta la correlación de los elementos con la distancia del río (DR), negativa para el Pb y Ni y positiva para el Cd, Cu y Zn. La bigráfica PCA 3 Vs PCA 1 muestra que las dimensiones de la mazorca MD y ML no están correlacionadas con la distancia DR, y el Cd y Cu se correlacionan de manera positiva entre sí, así como el Pb y Ni. La bigráfica del PCA 4 Vs PCA 1 muestra que el Zn no está asociado a ninguna variable y que la concentración de Cd se correlaciona positivamente con el diámetro de la mazorca (MD).

En las tres bigráficas mencionadas, los puntos correspondientes a la segunda etapa del muestreo se observan agrupados en la dirección de la correlación entre Ni y Pb y en la dirección opuesta a la correlación entre el Cu, el Cd y la DR. Esta observación señalaría los niveles de máxima concentración de Pb y Ni y menores de Cu y Cd en los granos colectados en el segundo muestreo, en la zona de la hacienda en dirección hacia el río.

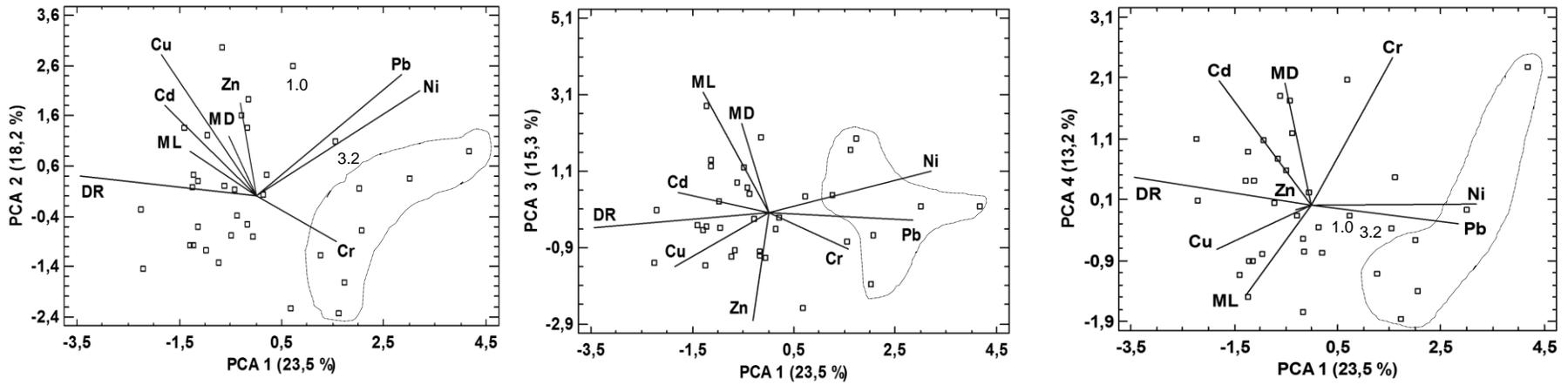
La Figura 13 (Tabla 49, Apéndice A.5 1) muestra las gráficas de las correlaciones significativas determinadas entre los elementos. El contenido de Cd se correlaciona con el diámetro de la mazorca de cacao, con un 96% de confianza (Figura 13 a). El Ni se correlaciona positivamente con la concentración de Pb (Figura 13 a) con un 99% de confianza; y el contenido de Cd y Zn se correlaciona positivamente con el contenido de Cu, con un 94% y 86% de confianza, respectivamente; En esta grafica también se observa que los puntos del segundo muestreo corresponden a los valores menores de concentración de los tres elementos Cd, Cu y Zn (Figura 13 c).

El Cu y el Zn son elementos esenciales por lo que su correlación es esperada. Por otra parte, la química del Zn y el Cd están relacionadas, debido a que el Cd entra a la planta por la proteína IRT1 que pertenece a la familia transportadora de Zn (Rodríguez et al., 2008), lo cual explica la asociación. En el caso del Pb y el Ni, su correlación podría estar relacionada con su carácter tóxico y no esencial, y con mecanismos regulatorios y específicos en la planta.

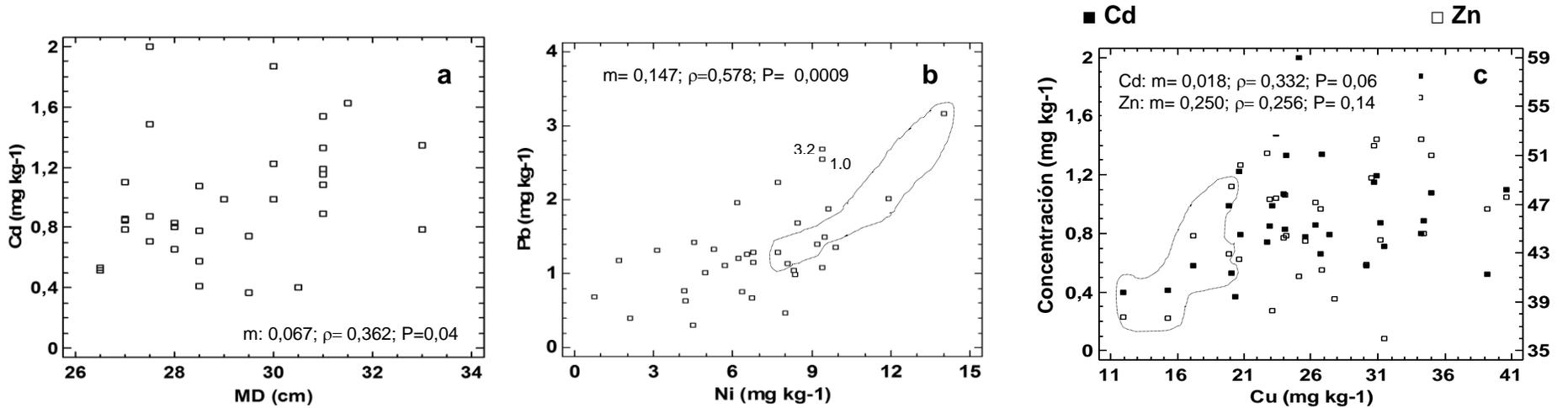
Tomando en cuenta que la distancia al río (DR) es una de las variables que separan el comportamiento de las concentraciones de los elementos en los granos de cacao se graficó el contenido metálico obtenido en los granos en función de esta variable. En estos gráficos (Figura 14) se muestra en líneas punteadas los límites máximos permitidos en normativas nacionales e internacionales.

La Figura 14 muestra el comportamiento general de los elementos. El contenido de Cd y Cu en el grano de cacao disminuye a medida que la ubicación de la muestra se acerca al Río Tuy, mientras que las concentraciones de Ni y Pb aumentan en esa dirección. Para el Cr y el Zn no se observó una tendencia definida con la distancia del río (DR). Estos resultados están reflejados en el estudio de PCA mencionado anteriormente.

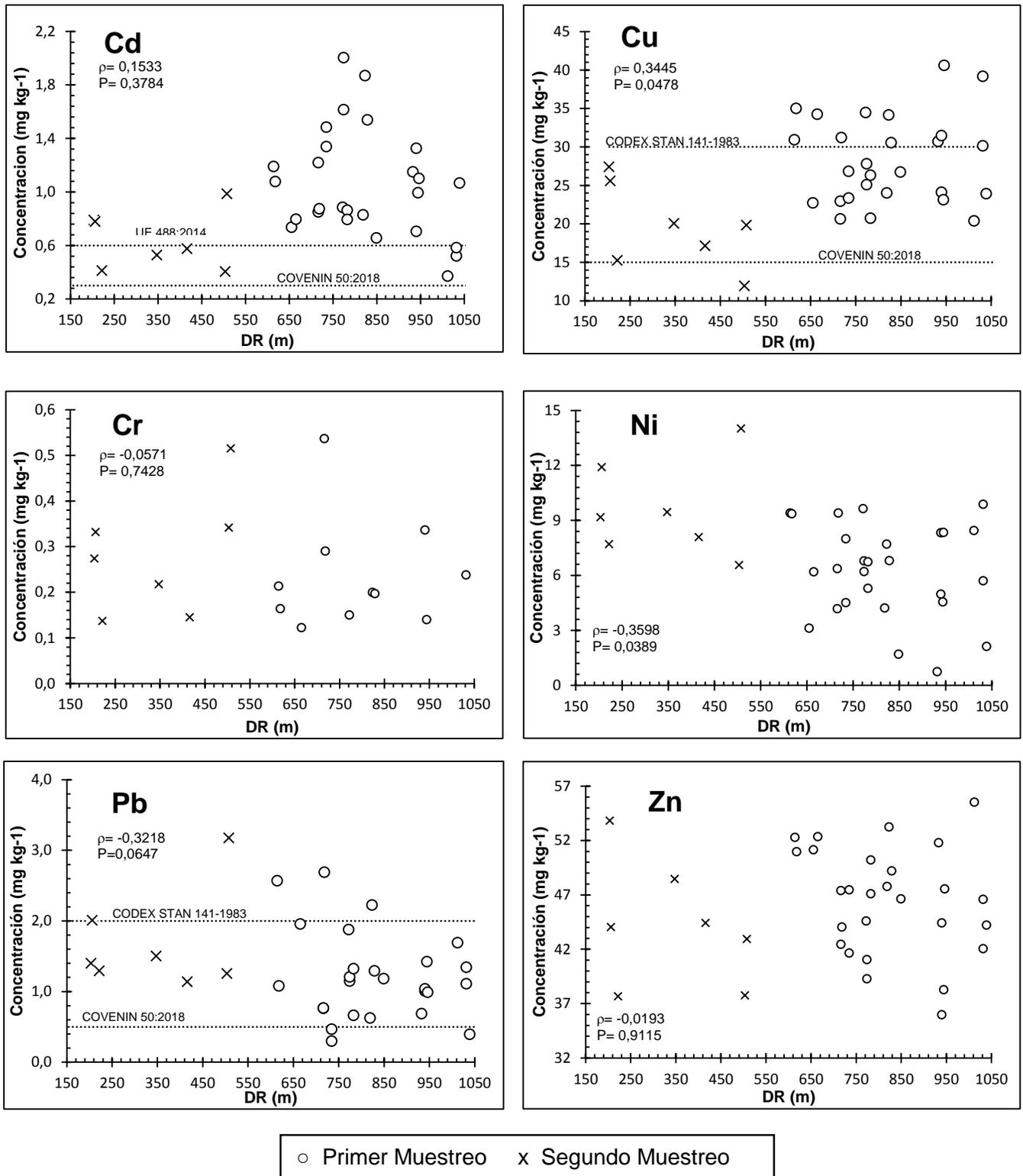
Sin embargo, en esta tendencia general se observan diferencias entre la sección hacia el río y la sección hacia la carretera, que corresponden a los dos muestreos realizados por separado (el primer muestreo se realizó desde el centro hacia la carretera (610 -1012 m); y el segundo muestreo se realizó desde el centro hacia el río (206 - 508 m)).



**Figura 12.** Bigráfica del PCA del muestreo de granos de cacao (n=34)  
 Nota: Puntos del segundo muestreo encerrados en línea punteada



**Figura 13.** Correlaciones significativas obtenidas para los elementos en granos de cacao  
 Nota: Puntos del segundo muestreo encerrados en línea punteada



**Figura 14.** Contenido de metales pesados en las muestras de granos analizados  
 Normativas en líneas punteadas

En base a esta observación se realizó por separado el estudio de PCA en cada sección. Para el primer muestreo (Apéndice A.5 2), en la sección desde el centro hacia la carretera, los resultados en la Figura 15 (a) muestran las correlaciones del Cd negativa con la DR, es decir, su concentración crece hacia el río; y positiva con la MD, indicando el aumento de la concentración en las mazorcas con mayor diámetro. También se presenta la correlación negativa del Zn con la DR, es decir, el aumento de la concentración del Zn hacia el río. Para los otros elementos las correlaciones con la distancia al río no son significativas, aunque se correlacionan entre sí (Figura 15 b).

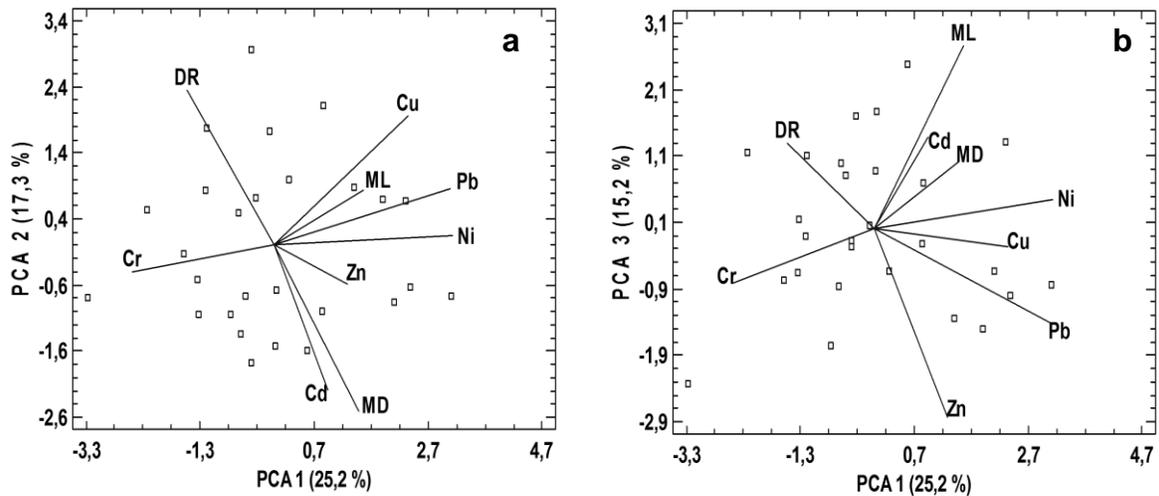
En la segunda sección, correspondiente al segundo muestreo, desde el centro hacia el río (Figura 16 y Apéndice A.5 3), se muestra la correlación negativa de ML con los elementos Cd, Cu, Ni y Zn, es decir, la longitud de la mazorca disminuye con el aumento de la concentración de estos metales. Estas correlaciones tienen una significancia  $P \leq 0,10$  y en el caso de Cd el elemento más tóxico, la correlación es  $P \leq 0,02$ . Para los elementos Cu y Zn se obtuvieron correlaciones negativas con la DR, es decir el aumento de su concentración hacia el río.

Estos resultados indican que en cada sección de muestreo los granos de cacao presentan un aumento significativo de la concentración de casi todos los elementos en la dirección hacia el río, lo cual representaría la influencia del río Tuy sobre el suelo de la hacienda.

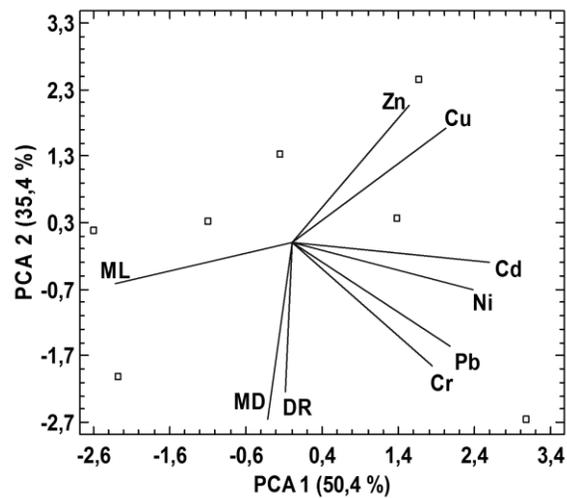
Sin embargo, la concentración total de Cd, Cu y Zn que presentan los granos en la sección del centro hacia la carretera es superior a la determinada en la otra sección. Esta diferencia en concentración es tan marcada que sesga el comportamiento de la concentración de los elementos con la DR que observamos en la tendencia general.

Estos resultados pudieran ser efectos temporales del muestreo (se realizó en dos etapas). Sin embargo, los puntos de muestreo 1.0 y 3.2, correspondientes al primer muestreo, presentaron concentraciones comparables a las obtenidas en los puntos cercanos a ellos, correspondientes al segundo muestreo y la tendencia del Cr, Ni y Pb en

todo el terreno es similar, por lo que pudiera considerarse que las concentraciones están más influenciadas por el comportamiento individual de cada elemento, la composición del suelo y la forma de cultivo.

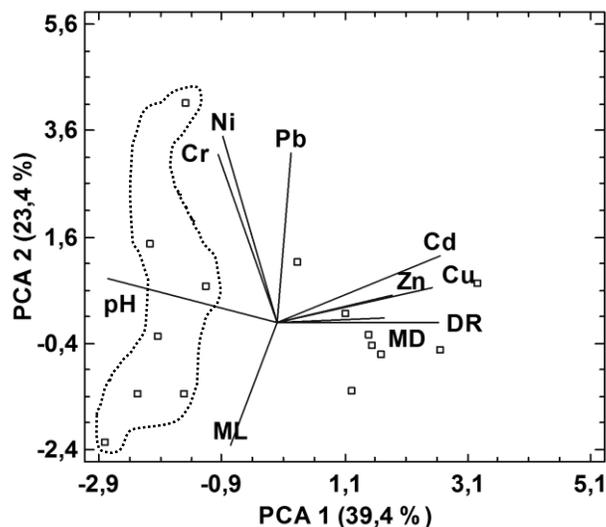


**Figura 15.** Bigráficas del PCA obtenidas en el primer muestreo (n=27)



**Figura 16.** Bigráfica del PCA obtenida en el segundo muestreo (n=7)

Un estudio de PCA realizado tomando en cuenta el pH de los suelos de la hacienda en los mismos puntos de muestreo donde se realizó la colecta de las mazorcas de cacao (Figura 17 y Apéndice 6) mostró que la concentración de los elementos Cr, Ni y Pb en los granos aumenta con el pH del suelo y la de Cd, Cu y Zn disminuye con el pH. El nivel de significancia determinado indicaría que los elementos Cd, Cu y Zn son más sensibles al pH que otros elementos. La Figura 17 también muestra el agrupamiento de los puntos correspondientes al segundo muestreo en la dirección del incremento del pH del suelo.



**Figura 17.** Bigráfica del PCA relación del suelo con los granos de cacao

Puntos del segundo muestreo encerrados en línea punteada

Estos resultados indican que la concentración del Cd, Cu y Zn en los granos de cacao aumenta con la acidez del suelo; esta variable de los suelos es una de los factores más importantes que influyen en la movilidad de los metales en el suelo, Por lo general, los suelos donde se cultiva el cacao son de tendencia ácida, típico de la región húmeda tropical (Barrueta, 2013). Adicionalmente, la sección de la hacienda que va desde el centro hasta la carretera es la que presenta las concentraciones mayores de Cd, Cu y Zn

en los frutos de cacao y los suelos más ácidos. Esta sección, no suele ser inundada por el río Tuy, es la zona más cultivada y cuidada de la hacienda, presenta mayor cantidad de cacaoteros y árboles que brindan sombra y donde se observa la mayor producción.

Por esto, el posible efecto de la inundación del Río Tuy sobre el contenido de los elementos en los frutos de cacao pareciera observarse para los elementos Ni y Pb, mientras que para el Cd y Cu la concentración en los frutos estaría relacionada con otras propiedades del suelo y las condiciones de cultivo (sombra, humedad y agroquímicos).

## VI CONCLUSIONES

Los estudios realizados mostraron que la concentración de los elementos en los chocolates está determinada por el contenido de cacao y la denominación de origen (DO), observándose las concentraciones mayores de Cd en la DO Carenero Superior y de Zn en la de Rio caribe y niveles comparables de Ni en ambas DO. El menor contenido de Cd se presentó en la DO Sur del Lago. De manera adicional, se determinó que la manufactura de los chocolates puede afectar adicionalmente el contenido de los elementos, observándose diferencias en su concentración entre marcas comerciales.

Todos los chocolates con  $\geq 70$  % de cacao presentaron concentraciones de Pb superiores a los niveles establecidos en todas las normativas nacionales e internacionales, independientemente de la DO y la marca; Los chocolates con  $\geq 70$  % de cacao de la DO Carenero Superior superaron el nivel máximo de Cd establecido por la norma UE 488:2014 de  $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$  y el límite máximo de Cu establecido por la norma nacional COVENIN 52:1999. El contenido de As estuvo por debajo del límite de detección en todos los chocolates.

Los granos de cacao no fermentados descascarillados y secos presentaron niveles de Cd superiores a los establecidos en las norma COVENIN 50:2018 y el 78% de ellos superó el límite establecido por la UE 488/2014; el 82% de los granos presentaron niveles de Cu superiores a la norma venezolana y el 35% el nivel establecido en el CODEX-STAN 141-1983; y en el caso del Pb, el 91% de las muestras superó los límites de la normas venezolana y el 15% el establecido en el CODEX-STAN 141-1983.

El comportamiento de concentración de los analitos en los granos de cacao en ambas secciones de la hacienda, la zona inundable y no inundable, fue similar, observándose el aumento de la concentración de los elementos en dirección hacia el rio, lo cual representaría la influencia del rio Tuy sobre el suelo de la hacienda. Sin embargo, los niveles superiores de Cd, Cu y Zn en los granos se presentaron en la zona no

inundable, y su concentración aumentó con la acidez determinada en los suelos de la hacienda, la cual es mayor en la zona no inundable.

Estos resultados sugieren que el factor determinante en la concentración de Cd y Cu en los frutos de cacao guarda relación con el pH de los suelos y se descarta el efecto de las inundaciones del Río Tuy. Por lo que se abre una interrogante sobre la influencia de la composición del suelo y la forma de cultivo en el pH de los suelos, como factores que determinan la concentración del Cd y Cu en los granos de cacao.

## VII RECOMENDACIONES

- Mejorar el programa de digestión para evitar el posible daño físico de los envases de teflón.
- Realizar el estudio de metales pesados en chocolate aumentando el número de marcas y denominaciones de origen.
- Realizar el muestreo en una sola etapa para evitar posibles cambios en la concentración por efectos temporales.
- Determinar el origen de la variación de acidez en los suelos de la hacienda y su relación con el contenido de los elementos Cd y Cu en los granos de cacao.

## VIII REFERENCIAS

- Allen, L.** (2013). Heavy Metals. Elsevier, Davis, USA, 344-351.
- Arévalo, E., Arévalo, C., Baligar, V., y He, Z.** (2017). Heavy Metal Accumulation in leaves and beans of cacao (*Theobroma cacao* L.) in major cacao growing regions in Peru. *Science of the Total Environment*, 605-606, 792-800.
- Arévalo, E., Obando, M., Zúñiga, L., Arévalo, C., Baligar, V., y Zhenli, H.** (2016). Metales Pesados en Suelos de Plantaciones de Cacao (*Theobroma cacao* L.) en tres Regiones del Perú. *Ecológia Aplicada*, 15(2), 81-89.
- Asociación Nacional del Café** (2004). Cultivo de Cacao. Consultado el 10 octubre de 2017. Disponible en: [http://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo\\_de\\_cacao](http://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=Cultivo_de_cacao)
- Barrueta, R.** (2013). Guía de Métodos de Detección y Análisis de Cadmio en Cacao (*Theobroma Cacao*L.). Consultado el 15 de noviembre de 2017. Disponible en: <https://es.slideshare.net/RIICCHPeru/guia-de-metodos-de-deteccion-y-analisis-de-cadmio-en-cacao>
- Bertoldi, D., Barbero, A., Camin, F., Caligiani, A., y Larcher, R.** (2016) Multielemental fingerprinting and geographic traceability of *Theobroma Cacao* beans and cocoa products. *Food Control*, 65, 46-53.
- Centro de Comercio Internacional** (2001). Cacao: Guía de Prácticas Comerciales. Consultado el 13 octubre de 2017. Disponible en: <http://www.intracen.org/uploadedFiles/intracenorg/Content/Publications/Cocoa%20-%20A%20Guide%20to%20Trade%20Practices%20Spanish.pdf>
- Chávez E., Stoffella P., Mylavarapu R., Moyano B., y Baligar V.** (2015). Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of the Total Environment*, 533, 205-214.

**CIVEN Cacao Industrias Venezolanas** (2017). Cacao Carenero Superior . Consultado el 18 de enero de 2018. Disponible en: [http://civengroup.com/Pagina/Cacao-Carenero-Superior\\_23/esp](http://civengroup.com/Pagina/Cacao-Carenero-Superior_23/esp)

**CIVEN Cacao Industrias Venezolanas** (2017). Cacao Río Caribe. Consultado el 18 de enero de 2018. Disponible en: [http://civengroup.com/Pagina/Cacao-Rio-Caribe\\_22/esp](http://civengroup.com/Pagina/Cacao-Rio-Caribe_22/esp)

**CIVEN Cacao Industrias Venezolanas** (2017). Cacao Sur Del Lago. Consultado el 18 de enero de 2018. Disponible en: [http://civengroup.com/Pagina/Cacao-Sur-Del-Lago\\_18/esp](http://civengroup.com/Pagina/Cacao-Sur-Del-Lago_18/esp)

**Codex - Stan** (1983). Cacao sin cáscara ni germen, cacao en pasta, torta de prensado de cacao y polvillo de cacao (finos de cacao) para el uso en la fabricación de productos de cacao y chocolate. Consultado e 27 de febrero de 2019. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/ninternacionales/CODEX-STAN-141-1983.pdf>

**Comisión del Codex Alimentarius** (2014). Niveles Máximos de cadmio para el cacao y productos derivados del cacao. Consultado el 14 de octubre. Disponible en: [http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/cccf9/cf09\\_06s.pdf](http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/cccf9/cf09_06s.pdf)

**De La Cruz, J., Vargas, M., y Del Ángel, A.** (2012). CACAO: Operaciones Poscosecha. Consultado el 23 de octubre de 2017. Disponible en: <http://www.fao.org/3/au995s.pdf>

**Directiva 2000/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo** (2013). Productos de cacao y de chocolate destinados a la alimentación humana. Consultado el 13 de mayo de 2019. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/Es/TXT/PDF/?uri=CELEX:02000L0036-20131118&rid=1>

- End, M., & Dand, R.** (2015). Cacao en Grano: Requisitos de Calidad de la Industria del Chocolate y del Cacao CAOBISCO/ECA/FCC. Consultado el 20 noviembre 2017. Disponible en: [http://www.cocoaquality.eu/data/Cacao%20en%20Grano%20Requisitos%20de%20Calidad%20de%20la%20Industria%20Apr%202016\\_es.pdf](http://www.cocoaquality.eu/data/Cacao%20en%20Grano%20Requisitos%20de%20Calidad%20de%20la%20Industria%20Apr%202016_es.pdf)
- Galán, E., & Romero, A.** (2008). Contaminación de Suelos por Metales Pesados. *Sociedad Española de Mineralogía*, 10, 48-60.
- Gómez, K., Rodríguez, E., Muñoz, M., Rivera, C., y Vera, C.** (2007). Cacao Ecológico: Exportación desde República Dominicana al Reino Unido (*Tesis de Maestría*). Universidad de Complutense Madrid, Madrid, España.
- González, E.** (1999). El Cacao en Venezuela. Consultado el 28 de Octubre de 2017. Disponible en. [http://www.fundacite-aragua.gob.ve/pdf/pf20040507-01cacao\\_egj.pdf](http://www.fundacite-aragua.gob.ve/pdf/pf20040507-01cacao_egj.pdf)
- Gramlich, A., Tandy, S., Gauggel, C., López, M., Perla D., Gonzalez, V., y Schulin, R.** (2017). Soil Cadmium Uptake by cocoa in Honduras. *Science of the Total Environment*, 612, 370-378.
- Henríquez, R.** (2011). Caracterización Geoquímica de Metales Pesados en los Sedimentos de fondo de la cuenca del Río Tuy, Venezuela (*Trabajo Especial de Grado*). Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Hernández, K., Beltrán, E., y Rodríguez, A.** (2017). Determinación de Cadmio en Chocolate de mesa comercializado en la zona metropolitana de San Salvador (*Trabajo Especial de Grado*). Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.
- ICCO** (2017). Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics Vol. XLIII, No. 3, Cocoa year 2016/17. Consultado el 27 de octubre de 2017. Disponible en: <https://www.icco.org/statistics/production-and-grindings/production.html>

- Instituto Nacional de Estadística** (2011). Informe Geo-Ambiental del Estado Miranda. Consultado el 10 de noviembre. Disponible en:  
<https://es.scribd.com/document/310273920/Informe-Geoambiental-Miranda>
- Lanza, J., Churrión, P., Liendo, N., y López, V.** (2016). Evaluación del Contenido de Metales Pesados en Cacao (*Theobroma cacao L*) de Santa Bárbara del Zulia, Venezuela. *Saber Universidad de Oriente*, 28(1), 106-115.
- Linnaeus, C.** (1753). *Theobroma Cacao*. *Species Plantarum*, 2:782, 253-254.
- Martin, S., y Griswold, W.** (2009). Human Health Effects of Heavy Metals. *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens*. 785, 532-651.
- MERCOSUR** (2012). Reglamento Técnico Mercosur Sobre Límites Máximos De Contaminantes Inorgánicos en Alimentos MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11. Consultado el 12 de octubre de 2017. Disponible en:  
[http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r\\_gmc\\_12-11.pdf](http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf)
- Mogollón, J., Ramirez, A., Guillén, R., y Bifano, C.** (1990). Heavy Metals and Organic Carbon in Sediments from the Tuy River basin, Venezuela. *Environmental Geochemistry and Health*, 12, 277-287.
- Mounicou, S., Szpunar, J., Andrey, D., Blake, C., y Lobinski, R.** (2003). Concentrations and Bioavailability of Cadmium and Lead in Cocoa Powder and Related Products. *Food Additives & Contaminants*, 20 (4), 343-352.
- Norma COVENIN 50:2018** (2018). Granos de Cacao (3<sup>era</sup> Revisión). Consultado el 7 de abril de 2018. Disponible en:  
[http://www.sencamer.gob.ve/publicos/descargas/pdf/covenin/COVENIN\\_50-2018.pdf](http://www.sencamer.gob.ve/publicos/descargas/pdf/covenin/COVENIN_50-2018.pdf)

**Norma COVENIN 52:1999** (1999). Chocolate (2<sup>da</sup> Revisión). FONFONORMA.

Consultado el 12 de octubre de 2017. Disponible en:

<http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/50-95.pdf>

**Norma COVENIN 1479:1998** (1998). Cacao en Polvo (2<sup>da</sup> Revisión). Consultado el 12 de octubre de 2017. Disponible en:

<http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1479-98.pdf>

**Norma COVENIN 1480: 1998** (1998). Licor de Cacao (Masa o Pasta de Cacao) 2da Revisión. Consultado el 12 de octubre de 2017. Disponible en:

<http://www.sencamer.gob.ve/sencamer/normas/1480-98.pdf>

**Nosis Trade** (2017). Exportación de granos de cacao en Venezuela. Consultado 14 de octubre de 2017. Disponible en: <https://trade.nosis.com/es/Comex/Importacion-Exportacion/Venezuela/granos-de-cacao--cascara-peliculas-y-demas-residuos-de-cacao/VE/1801>

**Nosis Trade** (2017). Exportación de cacao y derivados en Venezuela. Consultado el 14 de octubre de 2017. Disponible en: <https://trade.nosis.com/es/Comex/Importacion-Exportacion/Venezuela/cacao-y-sus-preparaciones/VE/18>

**Organización Mundial de la Salud (OMS)** (2017). Intoxicación por Plomo y Salud.

Consultado el 1 de 12 de 2017. Disponible en:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>

**Perkin Elmer** (1989). 0993-8199 Rev. D(11/89)

**Quintero, M.** (2015). Productos Básicos Agrícolas y Desarrollo: Producción y Comercialización del Cacao en Venezuela (*Tesis Doctoral*). Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

**Rodriguez, M., Martinez, N., Romero, M., Del Rio, L., y Sandalio M.** (2008).

Toxicidad del Cadmio en las plantas. *Ecosistemas*,17 (3) 139-1 46.

**Saber-ULA** (2008). Los Aromas de Chuao ratifican su origen. Consultado el 18 de enero de 2018. Disponible en:

<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/25008/2/articulo15.pdf>

**Takrama , J., Afrila , A., Jonfia-Essien , W., Agyemang, J., y Galyuon, I.** (2015).

Cadmium Contamination of Cocoa Beans and Cocoa Growing Agricultural Soils Of Ghana: There Is No Cause for Public Alarm. *Health and Management*, 3(4), 56-61.

**Unión Europea** (2014). Reglamento (UE) N° 488/2014 de la Comisión de 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. Consultado el 25 de octubre de 2017. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2014/138/L00075-00079.pdf>

**Unión Europea** (2018). Reglamento (UE) N° 2018/73. Modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los límites máximos de residuos de compuestos de mercurio en determinados productos. Consultado el 20 de febrero de 2019. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0073&from=ES>

**Yanus, R., Sela H., Borojovich E., Zakon Y., Saphier M, Nikokski A., y Karpas Z.** (2014). Trace Elements in Cocoa Solids and Chocolate: An ICP MS study. *Talanta*, 119, 1-4.

## IX APENDICES

## Apéndice 1: Figuras de Mérito

Tabla 30. Ecuaciones de las curvas de calibración obtenidas.

Muestras		As	Cd	Cu	Cr	Ni	Pb	Zn
Granos de Cacao	m	0,00153	0,02632	0,00317	0,00942	0,00233	0,00130	0,12944
	int	0,003579	0,02632	0,00802	0,00453	0,00802	0,00061	0,0061
	R <sup>2</sup>	0,96448	0,99680	0,99833	0,99497	0,99653	0,99831	0,99870
Chocolate 34% cacao	m		0,02820	0,00334	0,01064	0,00245	0,00131	
	int		0,0013	0,0687	0,0687	0,0315	0,0107	
	R <sup>2</sup>		0,99686	0,99417	0,99417	0,99712	0,96296	
Chocolate 41% cacao	m		0,0256	0,00256	0,01079	0,00253	0,00140	
	int		0,0651	0,0370	0,0222	0,0370	0,0026	
	R <sup>2</sup>		0,99654	0,99401	0,99323	0,99401	0,97874	
Chocolate 50% cacao	m		0,02709	0,00330	0,01070	0,00242	0,00128	
	int		0,0271	0,1317	0,0695	0,0487	0,0041	
	R <sup>2</sup>		0,99859	0,99002	0,99002	0,99603	0,99349	
Chocolates 58,8 - 61% cacao	m		0,02434	0,00313	0,01107	0,00249	0,00143	
	int		0,10071	0,19864	0,05563	0,06718	0,00119	
	R <sup>2</sup>		0,99710	0,99610	0,99840	0,99730	0,99760	
Chocolates 70 - 73,5% cacao	m		0,01975	0,00289	0,01008	0,01008	0,00230	
	int		0,12285	0,23552	0,07356	0,07356	0,07554	
	R <sup>2</sup>		0,99890	0,99220	0,99440	0,99440	0,99780	

- m: pendiente de la recta en  $\frac{s}{\mu\text{g L}^{-1}}$  para ET AAS y  $\frac{ua}{\text{mg L}^{-1}}$  para FAAS; int: intercepto en s para ET AAS y ua para FAAS.
- Cd, Cu, Cr, Ni y Pb: Curvas de calibración estándar externo para el análisis de granos de cacao y curvas de adición estándar para chocolates en ET AAS. As curva de adición estándar para todas las muestras en ET AAS. Zn, Curva de calibración estándar externo en FAAS para todas las muestras.

Tabla 31. Figuras de mérito asociadas a la sensibilidad obtenidas en la determinación de metales en chocolate comercial venezolano

Metal	$m_o$ pg	LOD <sub>i</sub> $\mu\text{g L}^{-1}$	LOD <sub>m</sub> $\text{mg kg}^{-1}$	Fd	Chocolate % cacao
Cd	4,5	0,07	0,0018	2	34, 41, 50
			0,0012	3	58,5 - 61
			0,0009	4	70, 73,5
			0,02	2	34, 41, 50
Cu	30	0,7	0,01	3	58,5 - 61
			0,008	4	70, 73,5
			0,006	2	34, 41, 50
			0,004	3	58,5 - 61
Cr	9	0,2	0,003	4	70, 73,5
			0,05	2	34, 41, 50
			0,03	3	58,5 - 61
			0,02	4	70, 73,5
Ni	38	1,9	0,02	2	34, 41, 50
			0,01	3	58,5 - 61
			0,02	4	70, 73,5
			0,01	3	58,5 - 61
Pb	72	0,86	0,01	4	70, 73,5
			0,02	2	34, 41, 50
			0,01	3	58,5 - 61
			0,01	4	70, 73,5

$m_o$ : masa característica; LOD<sub>i</sub>: Límite de detección instrumental;  
LOD<sub>m</sub>: Límite de detección metodológico; Fd: factor de dilución de la muestra

**Tabla 32.** Estudio del porcentaje de recuperación en granos de cacao

Elemento	n	Grano		Grano + Sp		[Sp] mg kg <sup>-1</sup>	%R <sup>a</sup>
		$\bar{X} \pm \text{sdv}$ mg kg <sup>-1</sup>	CV %	$\bar{X} \pm \text{sdv}$ mg kg <sup>-1</sup>	CV %		
Cadmio	1	1,13 ± 0,01	1	2,14 ± 0,01	1		
	2	1,31 ± 0,02 <sup>b</sup>	2	2,08 ± 0,02	1		
	3	1,06 ± 0,09	8	2,15 ± 0,03	2		
	4	1,11 ± 0,02	2	2,07 ± 0,01	1		
	5	1,13 ± 0,02	1	2,14 ± 0,06	3		
	6	1,07 ± 0,01	1	2,02 ± 0,02	1		
		<b>1,10 ± 0,03</b>	<b>3</b>	<b>2,10 ± 0,05</b>	<b>2</b>	<b>1,002</b>	<b>100</b>
Cobre	1	40,3 ± 0,7	2	54,2 ± 1,8	3		
	2	44,7 ± 0,3	1	54,9 ± 1,9	3		
	3	37,8 ± 2,8	7	54,8 ± 2,1	4		
	4	40,6 ± 0,2	1	55,8 ± 0,7	1		
	5	40,8 ± 1,6	4	54,9 <sup>c</sup>			
	6	39,3 ± 2,7	7	50,0 ± 0,7 <sup>b</sup>	1		
		<b>41 ± 2</b>	<b>6</b>	<b>55 ± 1</b>	<b>1</b>	<b>15,0</b>	<b>95</b>
Cromo	1	<LOD		0,19 ± 0,01	2		
	2	<LOD		0,12			
	3	<LOD		0,09 ± 0,01	10		
	4	<LOD		0,12 <sup>c</sup>			
	5	<LOD		0,10 <sup>c</sup>			
	6	<LOD		0,05 ± 0,01 <sup>b</sup>	7		
				<b>0,12 ± 0,04</b>	<b>31</b>	<b>0,200</b>	<b>103</b>
Níquel	1	8,6 ± 0,3	4	20,7 ± 0,4	2		
	2	9,8 ± 0,3	3	19,3 ± 1,8	9		
	3	8,4 <sup>c</sup>		20,7 ± 1,7	8		
	4	7,9 ± 0,1	2	19,3 ± 0,8	4		
	5	6,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	3	20,7 ± 2,0	9		
	6	9,9 <sup>c</sup>		16,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	1		
		<b>8,9 ± 0,9</b>	<b>10</b>	<b>20,1 ± 0,77</b>	<b>10</b>	<b>10,019</b>	<b>112</b>
Plomo	1	0,80 <sup>c</sup>		1,40 ± 0,04	3		
	2	0,98 ± 0,1	12	1,15 ± 0,07 <sup>b</sup>	6		
	3	0,60 <sup>b,c</sup>		1,16 ± 0,11 <sup>b</sup>	9		
	4	1,08 <sup>c</sup>		1,44 ± 0,2	13		
	5	0,65 ± 0,1 <sup>b</sup>	12	1,59 ± 0,05	3		
	6	1,12 ± 0,01	1	1,55 ± 0,03	2		
		<b>0,99 ± 0,14</b>	<b>14</b>	<b>1,49 ± 0,09</b>	<b>6</b>	<b>0,5210</b>	<b>96</b>

n, número de réplicas independiente;  $\bar{X} \pm \text{sdv}$ , concentración promedio y desviación estándar relativa de dos lecturas instrumentales; CV, coeficiente de varianza; Sp, contaminación agregada a las muestras previo a su tratamiento y medida; %R, porcentaje de recuperación obtenido (Ec.1 Pag.35)

<sup>a</sup> Cd, Cu, Ni con Fd= 10 ; Cr y Pb con Fd=5

<sup>b</sup> Datos no tomados en cuenta para la determinación del promedio señalado en negrita

<sup>c</sup> Única lectura instrumental

**Tabla 33.** Estudio del porcentaje de recuperación en chocolate con 73,5% cacao

Elemento	n	Chocolate		Chocolate+ Sp		[Sp] mg kg <sup>-1</sup>	%R <sup>a</sup>
		$\bar{X} \pm \text{sdv}$ mg kg <sup>-1</sup>	CV %	$\bar{X} \pm \text{sdv}$ mg kg <sup>-1</sup>	CV %		
Cadmio	1	1,35 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,1	1,96 ± 0,03 <sup>a</sup>	2	<b>0,4816</b>	<b>112</b>
	2	1,22 ± 0,01	0,1	1,75 ± 0,02	1		
	3	1,23 ± 0,01	0,4	1,75 ± 0,01	1		
	4	1,22 ± 0,02	1	1,72 ± 0,06	4		
	5	1,21 ± 0,01	0,1	1,79 ± 0,01	1		
	6	1,20 ± 0,02	2	1,77 ± 0,09	5		
		<b>1,22 ± 0,01</b>	<b>1</b>	<b>1,76 ± 0,02</b>	<b>1</b>		
Cobre	1	19,1 ± 0,6	3	32,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,3	<b>9,6324</b>	<b>106</b>
	2	16,4 ± 0,1	0,5	27,7 ± 0,1	0,4		
	3	16,7 ± 0,1	0,6	27,8 ± 0,1	0,3		
	4	17,4 <sup>b</sup>		27,7 ± 0,2	0,6		
	5	19,8 ± 1	6	28,7 ± 0,1	0,3		
	6	16,3 ± 0,1	0,6	27,3 ± 0,1	0,3		
		<b>17,6 ± 1,5</b>	<b>8</b>	<b>27,8 ± 0,5</b>	<b>2</b>		
Cromo	1	3,7 ± 0,4 <sup>a</sup>	1	3,38 ± 0,02 <sup>a</sup>	1	<b>1,2843</b>	<b>113</b>
	2	1,25 ± 0,04	3	2,74 ± 0,03	1		
	3	1,40 ± 0,01	1	2,60 ± 0,09	3		
	4	1,36 <sup>b</sup>		3,35 ± 0,05	1		
	5	1,17 ± 0,03	3	2,42 ± 0,02	1		
	6	1,22 ± 0,01	1	2,55 ± 0,03	1		
		<b>1,3 ± 0,1</b>	<b>8</b>	<b>2,7 ± 0,4</b>	<b>13</b>		
Níquel	1	13,84 ± 1,7 <sup>a</sup>	13	18,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	2	<b>6,0202</b>	<b>103</b>
	2	5,8 ± 0,4	7	11,9 ± 0,1	1		
	3	6,4 ± 0,2	3	11,3 ± 0,4	3		
	4	7,5 <sup>b</sup>		14,5 ± 0,5	3		
	5	8,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	6	11,6 ± 0,2	2		
	6	5,3 ± 0,2	4	12,8 ± 0,2	2		
		<b>6,2 ± 0,9</b>	<b>15</b>	<b>12 ± 1</b>	<b>10</b>		
Plomo	1	0,85 ± 0,03	3	2,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	2	<b>0,8027</b>	<b>117</b>
	2	0,82 ± 0,01	1	1,92 ± 0,02	1		
	3	0,90 ± 0,02	2	1,62 ± 0,05	3		
	4	0,83 ± 0,02	3	1,93 ± 0,04	2		
	5	0,78 ± 0,02	2	1,71 ± 0,02	1		
	6	1,50 ± 0,03 <sup>a</sup>	2	1,69 ± 0,05	3		
		<b>0,83 ± 0,04</b>	<b>5</b>	<b>1,8 ± 0,2</b>	<b>9</b>		

n, número de réplicas independiente;  $\bar{X} \pm \text{sdv}$ , concentración promedio y desviación estándar relativa de dos lecturas instrumentales; CV, coeficiente de varianza; Sp, contaminación agregada a las muestras previo a su tratamiento y medida; %R, porcentaje de recuperación obtenido (Ec.1 Pag.35)

<sup>a</sup> Datos no tomados en cuenta para la determinación del promedio señalado en negrita

<sup>b</sup> Única lectura instrumental

**Tabla 34.** Estudio del porcentaje de recuperación en chocolate con 61% cacao

Elemento	n	Chocolate		Chocolate+ Sp		[Sp] mg kg <sup>-1</sup>	%R <sup>a</sup>
		$\bar{X} \pm s_{dv}$ mg kg <sup>-1</sup>	CV %	$\bar{X} \pm s_{dv}$ mg kg <sup>-1</sup>	CV %		
Cadmio	1	0,62 <sup>b</sup>		0,98 ± 0,02	2		
	2	0,58 ± 0,01	2	0,99 ± 0,01	1		
	3	0,61 ± 0,03	5	0,99 ± 0,01	1		
	4	0,61 ± 0,03	2	1,01 ± 0,01	1		
	5	0,63 ± 0,01	2	0,99 ± 0,01	1		
	6	0,64 ± 0,01	2	1,00 ± 0,01	1		
		<b>0,62 ± 0,02</b>	<b>3</b>	<b>0,99 ± 0,01</b>	<b>1</b>	<b>0,3211</b>	<b>118</b>
Cobre	1	9,5 <sup>b</sup>		17,3 ± 0,1	1		
	2	8,9 ± 0,1	1	16,6 ± 0,2	1		
	3	9,3 ± 0,4	4	16,8 ± 0,5	3		
	4	9,2 ± 0,5	5	17,1 ± 0,2	1		
	5	9,5 ± 0,1	1	16,6 ± 0,5	3		
	6	9,5 ± 0,1	1	17,1 ± 0,1	1		
		<b>9,3 ± 0,3</b>	<b>3</b>	<b>16,9 ± 0,3</b>	<b>2</b>	<b>7,5063</b>	<b>101</b>
Cromo	1	0,76 <sup>b</sup>		1,74 ± 0,01	1		
	2	0,59 ± 0,02 <sup>a</sup>	3	1,60 ± 0,02	1		
	3	0,77 ± 0,10	13	1,71 ± 0,09	5		
	4	0,81 ± 0,07	9	1,74 ± 0,07	4		
	5	0,82 ± 0,01	1	1,67 ± 0,08	5		
	6	0,81 ± 0,01	1	1,70 ± 0,02	1		
		<b>0,79 ± 0,03</b>	<b>4</b>	<b>1,69 ± 0,05</b>	<b>3</b>	<b>0,9232</b>	<b>97</b>
Níquel	1	4,06 <sup>b</sup>		9,4 ± 0,2	2		
	2	3,4 ± 0,1	3	8,7 ± 0,3	3		
	3	3,9 ± 0,6	16	9,0 ± 0,5	5		
	4	4,0 ± 0,3	7	9,2 ± 0,4	4		
	5	4,3 ± 0,1	3	8,8 ± 0,3	4		
	6	4,2 ± 0,1	1	9,1 ± 0,1	2		
		<b>3,98 ± 0,4</b>	<b>9</b>	<b>9,04 ± 0,2</b>	<b>3</b>	<b>4,8169</b>	<b>105</b>
Plomo	1	0,13 <sup>a,b</sup>		0,71 ± 0,01	1		
	2	0,21 ± 0,01	6	0,72 ± 0,06	8		
	3	0,13 ± 0,03 <sup>a</sup>	22	0,69 ± 0,05	7		
	4	0,24 ± 0,05	22	0,73 ± 0,02	3		
	5	0,35 ± 0,01	1	0,67 ± 0,04	6		
	6	0,36 ± 0,01	1	0,71 ± 0,01	2		
		<b>0,29 ± 0,07</b>	<b>25</b>	<b>0,70 ± 0,02</b>	<b>3</b>	<b>0,5620</b>	<b>74</b>

n, número de réplicas independiente;  $\bar{X} \pm s_{dv}$ , concentración promedio y desviación estándar relativa de dos lecturas instrumentales; CV, coeficiente de varianza; Sp, contaminación agregada a las muestras previo a su tratamiento y medida; %R, porcentaje de recuperación obtenido (Ec.1 Pag.35)

<sup>a</sup> Datos no tomados en cuenta para la determinación del promedio señalado en negrita

<sup>b</sup> Única lectura instrumental

## Apéndice 2: Análisis multivariado en chocolate comercial venezolano

### A. 2. 1 Análisis de componentes principales en Chocolates con 34 - 73,5 % de cacao

**Tabla 35.** Análisis de componentes principales en muestras de chocolates comercial (n= 14)

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	5,25279	75,040	75,040
2	0,803862	11,484	<b>86,524</b>
3	0,497883	7,113	93,636
4	0,27067	3,867	97,503
5	0,108582	1,551	99,054
6	0,0485787	0,694	99,748
7	0,0176337	0,252	100,000

**Tabla 36.** Pesos de los componentes en chocolates (n= 14)

	Componentes						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>%C</b>	0,407019	0,0884401	0,424678	0,211236	-0,219844	-0,463105	-0,582017
<b>Cd</b>	0,354129	-0,15303	-0,708905	0,506217	0,0804386	0,144861	-0,254789
<b>Cu</b>	0,42182	0,11593	0,0220754	0,214382	-0,557858	-0,0643663	0,668455
<b>Cr</b>	0,334913	0,52429	-0,374052	-0,662326	-0,096188	-0,00597363	-0,158349
<b>Ni</b>	0,419872	-0,0103598	0,0810929	-0,0296032	0,756181	-0,358616	0,340195
<b>Pb</b>	0,273879	-0,822838	-0,0301673	-0,462012	-0,17785	-0,0298663	-0,0322541
<b>Zn</b>	0,409301	0,0571952	0,411356	0,0124912	0,145946	0,794275	-0,0875138

**Tabla 37.** Componentes principales en chocolates (n= 14)

Fila	Componentes						
	1	2	3	4	5	6	7
1	-4,06187	-1,05709	-0,555721	-0,531436	-0,00158445	0,332122	0,0159396
2	-3,12144	-0,731086	-0,483622	0,0510333	0,117378	0,00744279	0,120562
3	-2,61033	-0,426197	0,0595591	-0,164454	-0,0684187	-0,472403	-0,0941234
4	-0,226142	0,219962	-0,30329	1,11406	0,555731	-0,0402679	-0,0203777
5	1,03416	1,20107	-1,06701	-0,711427	-0,0431784	-0,321887	0,00914415
6	-0,421161	1,17124	0,802267	-0,649114	0,309211	0,210918	-0,183623
7	-0,223439	0,637167	0,427057	0,490417	-0,0432856	0,087565	0,244595
8	-0,615109	0,943261	0,397243	0,0708095	-0,69199	0,169123	0,0232962
9	-0,312199	1,02613	-0,103157	0,437352	-0,297988	-0,00537849	0,00565184
10	0,0933035	0,0843637	-0,0851289	0,3868	0,165801	-0,0622757	-0,143268
11	3,8504	-0,0000448632	-0,747016	-0,320898	0,337762	0,264851	0,0177181
12	1,37867	-0,608876	1,55051	-0,496114	0,280006	-0,18158	0,186527
13	1,39939	-1,1997	0,656671	0,320151	-0,257588	0,0554594	-0,230253
14	3,83578	-1,2602	-0,548364	0,00281728	-0,361856	-0,0436895	0,0482111

**Tabla 38.** Correlación ordinal de Spearman en chocolate comercial venezolano (n= 14)

	<b>Cd</b>	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
<b>%C</b>	0,5426 <b>0,0504</b>	0,8829 <b>0,0015</b>	0,6345 <b>0,0221</b>	0,8468 <b>0,0023</b>	0,5126 <b>0,0646</b>	0,9100 <b>0,0010</b>
<b>Cd</b>		0,7107 <b>0,0104</b>	0,4664 <b>0,0926</b>	0,6975 <b>0,0119</b>	0,3212 0,2468	0,4224 0,1277
<b>Cu</b>			0,6835 <b>0,0137</b>	0,8505 <b>0,0022</b>	0,4330 <b>0,1185</b>	0,7758 <b>0,0052</b>
<b>Cr</b>				0,6659 <b>0,0163</b>	-0,0462 0,8678	0,5473 <b>0,0485</b>
<b>Ni</b>					0,4857 <b>0,0799</b>	0,8110 <b>0,0035</b>
<b>Pb</b>						0,4374 0,1148

Correlación  
Valor-P

### A. 2. 2 Análisis de componentes principales en Chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao

**Tabla 39.** Análisis componentes principales en chocolate entre 58,5-61 % de cacao (n= 7)

<b>Componente Número</b>	<b>Eigenvalor</b>	<b>Porcentaje de Varianza</b>	<b>Porcentaje Acumulado</b>
1	2,71347	45,224	45,224
2	1,50462	25,077	70,301
3	1,16681	19,447	<b>89,748</b>
4	0,414799	6,913	96,662
5	0,200136	3,336	99,997
6	0,000169225	0,003	100,000

**Tabla 40.** Pesos de los componentes en chocolates entre 58,5-61 % de cacao (n= 7)

	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>	<b>Componente 3</b>
<b>Cd</b>	0,532864	-0,0351188	-0,437253
<b>Cu</b>	0,333906	-0,563787	0,318467
<b>Cr</b>	0,248219	0,120376	0,787661
<b>Ni</b>	0,369891	0,573406	-0,141317
<b>Pb</b>	0,411402	0,406306	0,179894
<b>Zn</b>	-0,486702	0,415381	0,186133

**Tabla 41.** Componentes principales en chocolates entre 58,5-61 % de cacao (n= 7)

Fila	Componente		
	1	2	3
1	0,565077	0,257415	-1,93247
2	0,875641	1,00085	-0,572025
3	2,81847	0,334479	1,40388
4	-0,593528	-0,269963	-0,103293
5	-2,36705	1,74857	0,742185
6	-1,12503	-1,5566	0,61831
7	-0,17358	-1,51476	-0,156593

**Tabla 42.** Correlación ordinal de Spearman en chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n= 7)

	Cd	Cu	Cr	Ni	Pb	Zn
%C	-0,2673	0,1336	0,2673	-0,1336	0,4009	0,2673
	0,5127	0,7434	0,5127	0,7434	0,3261	0,5127
Cd		0,1429	-0,2857	0,7143	0,4643	-0,6786
		0,7264	0,4840	<b>0,0802</b>	0,2554	<b>0,0965</b>
Cu			0,2143	-0,0357	0,2143	-0,4643
			0,5997	0,9303	0,5997	0,2554
Cr				0,0714	-0,1429	-0,2500
				0,8611	0,7264	0,5403
Ni					0,7143	-0,2857
					<b>0,0802</b>	0,4840
Pb						0,0714
						0,8611
Correlación						
valor-P						

### Apéndice 3: Pruebas de significancia en chocolate entre 58,5 - 61 % de cacao

**Tabla 43.** Pruebas de significancia entre denominaciones de origen para chocolate entre 58,5-61 % de cacao (n=7)

Elemento	Levene	ANOVA		Prueba de Múltiples
	Prueba de Varianzas Valor-P	Prueba de Medias		Rangos
		Valor-P	Razón-F	
Cd	<b>0,0372</b>	-	-	1 > 2 ≈ 3
Cu	0,2631	0,510	0,6342	3 ≥ 1 = 2
Cr	0,5395	0,9710	0,03	1 ≥ 2 = 3
Ni	0,107936	<b>0,0185</b>	12,69	1 ≥ 2 > 3
Pb	0,618028	0,1640	2,94	1 ≥ 2 = 3
Zn	0,391619	<b>0,0552</b>	6,51	2 > 3 = 1

DO: 1= Carenero Superior, 2= Río Caribe, 3= Sur del Lago

**Tabla 44.** Pruebas de contraste de la concentración de metales entre marcas para chocolates entre 58,5 - 61 % de cacao (n=7)<sup>a</sup>

Elemento	DO	Prueba F			Prueba t (una cola)			GL	Diferencias entre marcas
		F <sub>ex</sub>	F <sub>teo</sub>	GL <sup>b</sup>	s	t <sub>exp</sub>	t <sub>crit</sub>		
Cd	1	8,9	39,3	5,2	0,018	-6,31	1,89	7	B(60) > A(61)
		1,2	921,8	5,1	0,020	-9,04	1,94	6	A(58,5) > A(61)
		7,4	38,5	1, 2	0,012	6,32	2,35	3	A(58,5) > B(60)
	2	68,0	647,8	1,1	0,011	28,16	2,92	2	B(60) > C
		0,0	647,8	1,1	0,014	17,28	2,92	2	Bc(60) > B(60)
		6,2	39,3	5,2	0,226	-14,92	1,89	7	B(60) > A(61)
Cu	1	1,15	921,8	5,1	0,26	2,37	1,94	6	A(58,5) = A(61)
		5,4	38,5	1, 2	0,163	-19,30	2,35	3	B(60) > A(58,5)
		2,4	647,8	1,1	0,255	-13,85	2,92	2	B(60) > C(60)
Cr	1	178,54	647,8	1,1	0,25	0,29	2,92	2	B(60) = Bc(60)
		55,59	39,3	5,2		7,77	2,92	2	B(60) > A(61)
		1078,6	921,8	5,1		20,27	2,02	5	A(61) > A(58,5)
Ni	2	59963,0	799,5	2,1		9,73	2,92	2	B(60) > A(58,5)
		1,0	647,8	1,1	0,081	5,21	2,92	2	C(60) > B(60)
		1,05	647,8	1,1	0,08	-0,34	2,92	2	B(60) = C(60)
	1	1,2	39,3	5,2	0,344	-2,44	1,89	7	B(60) > A(61)
		8,04	921,8	5,1	0,32	-1,07	1,94	6	A(58,5) = A(61)
		5,76	799,5	2,1	0,27	1,24	2,35	3	A(58,5) = B(60)
Pb	2	7,54	647,8	1,1	0,10	0,94	2,92	2	C(60) = B(60)
		55,85	647,8	1,1	0,43	1,85	1,89	2	B(60) = Bc(60)
		26,78	39,30	5,2	0,06	0,43	1,94	7	A(61) = B(60)
	1	43,5	921,8	5,1	0,067	2,50	1,94	6	A(61) > A(58,5)
		1,6	799,5	2,1	0,013	9,77	2,35	3	B(60) > A(58,5)
		31,18	647,8	1,1	0,05	0,14	2,92	2	B(60) = C(60)
Zn	3	232,02	647,8	1,1	0,06	0,78	2,92	2	B(60) = Bc(60)
		15,19	39,30	5,2	1,89	1,05	1,89	7	A(61) = B(60)
		5,78	921,8	5,1	1,90	0,58	1,94	6	A(58,5) = A(61)
	2	2,63	38,51	1, 2	0,70	0,79	2,35	3	A(58,5) = B(60)
		24,93	647,8	1,1	0,88	2,04	2,92	2	C(60) = B(60)
		3,36	647,8	1,1	1,11	0,89	2,92	2	B(60) = Bc(60)

<sup>a</sup> P≥0,05 para todos los casos excepto para Ni con P≥0,10; <sup>b</sup> GL: grados de libertad del numerador y denominador en paréntesis el porcentaje de cacao

### Apéndice 4: Concentración de metales en muestras de granos de cacao

**Tabla 45.** Concentración de metales en granos de cacao en mg kg<sup>-1</sup>

ID <sup>a</sup>	ML cm	MD cm	Cd	Cu	Cr	Ni	Pb	Zn	Distancia m
9.2	16,5	27	0,8 ± 0,1 (16)	27 ± 2 (6)	0,3 ± 0,1 (53)	9,2 ± 0,8 (9)	1,4 ± 0,1 (9)	54 ± 2 (4)	203,7
9.3	18	28,5	0,78 ± 0,09 (11)	25,6 ± 0,3 (1)	0,33 ± 0,05 (15)	12 ± 1 (8)	2,0 <sup>b</sup>	44 ± 1 (2)	206,3
9.1	20	28,5	0,41 ± 0,03 (8)	15 ± 1 (5)	0,14 ± 0,03 (22)	7,7 ± 0,5 (6)	1,3 ± 0,2 (15)	37,7 ± 0,2 (0,5)	221,9
8.2	18	26,5	0,53 ± 0,05 (9)	20 ± 3 (13)	0,22 ± 0,04 (18)	10 ± 2 (20)	1,5 ± 0,8 (51)	48 ± 1 (2)	347,5
8.1	18	28,5	0,58 ± 0,04 (8)	17 ± 1 (5)	0,15 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,5 (6)	1,1 ± 0,6 (52)	44 ± 1 (2)	416,2
X 2	19	30,5	0,40 ± 0,04 (10)	12 ± 1 (7)	0,3 ± 0,2 (58)	6,6 ± 0,3 (4)	1,3 ± 0,3 (26)	38 ± 1 (3)	503,5
X 1	17	30	0,99 ± 0,07 (8)	19,8 ± 0,1 (0,3)	0,52 ± 0,02 (5)	14,0 ± 0,8 (6)	3,2 ± 0,6 (18)	42,9 ± 0,9 (2,1)	507,6
1.0	20	31	1,2 ± 0,1 (9)	30,9 ± 0,2 (1)	0,21 ± 0,03 (15)	9 ± 1 (1)	2,6 ± 0,1 (4)	52 ± 2 (3)	613,9
1.1	18	31	1,1 ± 0,1 (11)	35 ± 3 (8)	0,16 ± 0,02 (14)	9,4 ± 0,7 (8)	1,1 ± 0,2 (16)	51 ± 2 (5)	617,9
1.2	17	29,5	0,74 ± 0,04 (5)	23 ± 1 (4)	< LOD	3,1 ± 0,2 (8)	< LOD	51 ± 1 (2)	655,0
2.1	18,5	28	0,80 ± 0,01 (1)	34 ± 3 (8)	0,12 ± 0,02 (16)	6,2 ± 0,5 (8)	2,0 ± 0,2 (27)	52,3 ± 0,1 (0,2)	664,9
2.0.1	19,5	30	1,22 ± 0,01 (4)	20,6 ± 0,2 (1)	< LOD	6,4 ± 0,3 (5)	0,8 ± 0,2 (27)	42 ± 1 (3)	716,1
2.0.2	15,2	27	0,85 ± 0,01 (0,4)	23,0 ± 0,1 (0,4)	0,54 <sup>b</sup>	4,2 ± 0,6 (14)	0,8 <sup>b</sup>	47,4 ± 0,1 (0,2)	716,1
3.2	17,5	27,5	0,87 ± 0,01 (2)	31,2 ± 0,3 (1)	0,29 <sup>b</sup>	9 ± 1 (10)	2,7 ± 0,2 (8)	44 ± 1 (2)	718,4
2.2.1	18,5	27,5	1,48 ± 0,05 (3)	23 ± 1 (4)	< LOD	4,5 ± 0,3 (6)	0,3 ± 0,1 (18)	47,5 ± 0,2 (0,4)	734,4
2.2.2	22	33	1,34 ± 0,01 (0,5)	27 ± 1 (3)	< LOD	8,0 ± 0,2 (2)	0,5 ± 0,1 (20)	42 ± 1 (2)	734,4
3.1	23	31	0,89 ± 0,07 (8)	34 ± 3 (7)	< LOD	9,6 ± 0,9 (10)	1,9 ± 0,3 (15)	45 ± 1 (2)	772,1
4.1.1	17	31,5	1,62 ± 0,01 (0,6)	27,8 ± 0,1 (0,4)	< LOD	6,8 ± 0,6 (9)	1,15 ± 0,01 (1)	39 ± 1 (4)	773,9
4.1.2	21	27,5	2,0 ± 0,2 (9)	25 ± 3 (11)	< LOD	8,0 ± 0,2 (2)	1,2 ± 0,1 (10)	41 ± 3 (7)	773,9
3.0.1	18	27	0,86 ± 0,01 (1)	26 ± 3 (10)	< LOD	5,3 ± 0,6 (2)	1,3 ± 0,1 (8)	47 ± 2 (3)	782,5
3.0.2	18	33	0,79 ± 0,08 (10)	21 ± 1 (4)	< LOD	6,7 ± 0,1 (1)	0,7 ± 0,1 (21)	50 ± 2 (4)	782,5
4.2	17	28	0,83 ± 0,04 (5)	24 ± 1 (4)	< LOD	4,2 ± 0,6 (14)	0,6 ± 0,1 (21)	48 ± 4 (9)	818,7
4.0	18	30	1,87 ± 0,08 (4)	34 ± 3 (9)	0,2 ± 0,1 (53)	7,7 ± 0,9 (12)	2,2 ± 0,1 (4)	53,2 ± 0,2 (0,4)	823,1
5.1	17	31	1,54 ± 0,01 (0,5)	30,5 ± 0,3 (1)	0,20 ± 0,01 (6)	6,8 ± 0,3 (5)	1,3 ± 0,1 (11)	49 ± 1 (2)	828,6
5.2	20	28	0,66 ± 0,04 (6)	27 ± 2 (6)	1,07 ± 0,10 <sup>c</sup> (10)	1,7 ± 0,9 (51)	1,2 ± 0,1 (11)	47 ± 1 (2)	848,9
5.0	17	31	1,15 ± 0,05 (4)	31 ± 2 (5)	< LOD	0,8 ± 0,3 (12)	0,7 ± 0,2 (21)	52 ± 4 (8)	932,6
6.2.1	19	27,5	0,71 ± 0,01 (2)	31 ± 1 (3)	< LOD	0,5 ± 0,1 (2)	1,0 ± 0,2 (21)	36 ± 1 (3)	940,0
6.2.2	18,5	31	1,33 ± 0,09 (7)	24 ± 1 (6)	0,34 <sup>b</sup>	8,3 ± 0,3 (4)	1,0 ± 0,1 (10)	44 ± 1 (1)	940,0
6.1	20	29	0,99 ± 0,02 (2)	23 ± 2 (9)	0,14 <sup>b</sup>	4,6 ± 0,2 (4)	1,4 ± 0,1 (7)	38 ± 2 (4)	944,3
6.0	21	27	1,10 ± 0,03 (3)	41 ± 2 (6)	< LOD	8,3 ± 0,3 (4)	1,0 ± 0,1 (14)	48 ± 2 (4)	946,1
7.2	20,5	29,5	0,37 ± 0,02 (4)	20 ± 1 (3)	< LOD	8,4 ± 0,3 (3)	1,7 ± 0,2 (12)	56 ± 1 (1)	1011,9
7.0.1	19	26,5	0,52 ± 0,04 (8)	39 ± 2 (5)	< LOD	5,7 ± 0,3 (6)	1,1 ± 0,2 (15)	47 ± 1 (3)	1031,6
7.0.2	17	28,5	0,58 ± 0,01 (3)	30,1 ± 0,1 (0,2)	0,24 ± 0,02 (7)	9,9 ± 0,3 (3)	1,3 ± 0,1 (8)	42,1 ± 0,3 (0,6)	1031,6
7.1	19,5	28,5	1,07 ± 0,02 (1)	23,9 ± 0,1 (0,4)	< LOD	2,1 ± 0,2 (8)	0,4 ± 0,1 (31)	44 ± 2 (4)	1038,9

Promedio para dos replicas independientes y CV en paréntesis; ML: longitud de la mazorca; MD: diámetro de la mazorca; LOD: límite de detección  
<sup>a</sup> Orden de los datos en función de su distancia al Río Tuy; <sup>b</sup> Sin replica instrumental; <sup>c</sup> Dato anómalo

## Apéndice 5: Análisis multivariado en granos de cacao

### A.5. 1 Muestreo Total

**Tabla 46.** Análisis de componentes principales en granos de cacao, muestreo total(n=34)

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	2,11538	23,504	23,504
2	1,64064	18,229	41,734
3	1,38415	15,379	57,113
4	1,19211	13,246	<b>70,359</b>
5	0,971411	10,793	81,152
6	0,667654	7,418	88,571
7	0,441879	4,910	93,480
8	0,37008	4,112	97,592
9	0,216694	2,408	100,000

**Tabla 47.** Pesos de los componentes en granos de cacao, muestreo total (n=34)

	Componente			
	1	2	3	4
<b>Cd</b>	-0,278582	0,342329	0,10294	0,493304
<b>Cu</b>	-0,286744	0,531644	-0,264332	-0,175102
<b>Cr</b>	0,244212	-0,171011	-0,175701	0,587535
<b>Ni</b>	0,498159	0,395044	0,205749	0,00822648
<b>Pb</b>	0,443582	0,454987	-0,0335321	-0,0701687
<b>Zn</b>	-0,0481395	0,35058	-0,531806	-0,0154759
<b>DR</b>	-0,535367	0,0748687	-0,0726531	0,114368
<b>ML</b>	-0,199795	0,167608	0,599743	-0,356027
<b>MD</b>	-0,0821545	0,22637	0,444314	0,485518

DR: distancia del Rio Tuy; ML: longitud de la mazorca; MD: diametro de la mazorca

**Tabla 48.** Componentes principales en granos de cacao, muestreo total (n=34)

Fila	Componente				Fila	Componente			
	1	2	3	4		1	2	3	4
1	2,0144	0,156115	-1,84608	-0,561575	18	-0,616579	0,216824	0,793618	1,80035
2	2,99935	0,359882	0,166079	-0,0615911	19	-1,13045	0,29646	1,22129	0,409553
3	1,73294	-1,72151	1,96502	-1,85659	20	-0,174788	-0,556718	-0,997529	-0,537925
4	2,05775	-0,682173	-0,583095	-1,39448	21	-0,379672	-0,374326	0,493121	1,19223
5	1,2573	-1,17881	0,485922	-1,11848	22	-0,732478	-1,3259	-1,14587	0,053457
6	1,61534	-2,32663	1,64448	0,459442	23	-0,65538	2,9758	-0,973641	0,781082
7	4,17471	0,905789	0,184807	2,28068	24	-0,946173	1,21045	-0,372987	1,0749
8	0,720555	2,60273	0,445429	-0,168847	25	-1,21353	-0,97876	-0,333534	-0,908783
9	-0,28742	1,6231	-0,152745	-0,163763	26	-2,24231	-0,269577	-1,30137	1,08998
10	-0,0609304	-0,814309	-1,15915	0,211143	27	-0,967861	-1,06884	0,312875	-0,792407
11	-0,174753	1,36254	-1,0937	-1,74647	28	-0,416739	0,135873	0,658337	1,7251
12	-0,493698	-0,774074	1,18872	0,580164	29	-1,13707	-0,596222	1,39743	-0,90292
13	0,6768	-2,22459	-2,49068	2,06285	30	-1,39743	1,36636	-0,303551	-1,13762
14	1,54141	1,09228	-0,755836	-0,366643	31	0,204543	0,431531	-0,104448	-0,779061
15	-1,28446	-0,98111	-0,44719	0,406697	32	-1,24303	0,183867	-1,3533	-1,49181
16	-1,22697	0,422458	2,80107	0,879956	33	0,136886	0,0312572	-0,408328	-0,353782
17	-0,147895	1,93845	1,9781	-0,753805	34	-2,20237	-1,43821	0,0867348	0,0889888

**Tabla 49.** Correlación ordinal de Spearman en granos de cacao, muestreo total (n=34)

	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>	<b>DR</b>	<b>ML</b>	<b>MD</b>
<b>Cd</b>	0,3321 <b>0,0564</b>	-0,0149 0,9316	-0,0613 0,7248	-0,1917 <b>0,2709</b>	0,0482 0,7818	0,1533 0,3784	0,0310 0,8589	0,3624 <b>0,0373</b>
<b>Cu</b>		-0,1661 0,3399	0,0940 0,5893	0,0882 0,6125	<b>0,2562</b> <b>0,1410</b>	0,3445 <b>0,0478</b>	0,0631 0,7169	-0,0395 0,8204
<b>Cr</b>			0,0172 0,9215	-0,1168 0,5022	-0,1803 0,3004	-0,0571 0,7428	-0,2066 0,2353	-0,0975 0,5754
<b>Ni</b>				<b>0,5785</b> <b>0,0009</b>	-0,0104 0,9524	-0,3596 <b>0,0389</b>	0,0150 0,9314	0,1667 0,3381
<b>Pb</b>					0,1331 0,4445	-0,3216 <b>0,0647</b>	-0,0637 0,7145	-0,0439 0,8008
<b>Zn</b>						-0,0193 0,9115	-0,2677 0,1241	-0,0104 0,9524
<b>DR</b>							0,2229 0,2004	-0,0012 0,9944
<b>ML</b>								0,0630 0,7174

Correlación

Valor-P

DR: distancia del Rio Tuy; ML: longitud de la mazorca ; MD: diámetro de la mazorca

### A.5. 2 Primer Muestreo

**Tabla 50.** Análisis de Componentes Principales en granos de cacao primer muestreo (n=27)

<b>Componente Número</b>	<b>Eigenvalor</b>	<b>Porcentaje de Varianza</b>	<b>Porcentaje Acumulado</b>
1	2,27233	25,248	25,248
2	1,55453	17,273	42,521
3	1,39746	15,527	<b>58,048</b>
4	0,946181	10,513	68,561
5	0,873189	9,702	78,263
6	0,66903	7,434	85,697
7	0,551084	6,123	91,820
8	0,46476	5,164	96,984
9	0,271438	3,016	100,000

**Tabla 51.** Pesos de los Componentes en granos de cacao primer muestreo (n=27)

	Componente		
	1	2	3
<b>Cd</b>	0,146186	-0,462732	0,288024
<b>Cu</b>	0,369699	0,414688	-0,0559113
<b>Cr</b>	-0,391576	-0,086465	-0,169767
<b>Ni</b>	0,490651	0,0333218	0,0916367
<b>Pb</b>	0,485475	0,179808	-0,291989
<b>Zn</b>	0,201399	-0,121276	-0,587348
<b>DR</b>	-0,239059	0,496911	0,266515
<b>ML</b>	0,2462	0,174835	0,574508
<b>MD</b>	0,232103	-0,529906	0,213011

DR: distancia del Río Tuy; ML: longitud de la mazorca;  
MD: diámetro de la mazorca ;

**Tabla 52.** Componentes Principales en granos de cacao primer muestreo (n=27)

Fila	Componente			Fila	Componente		
	1	2	3		1	2	3
1	3,10443	-0,772996	-0,83504	15	-1,59479	-0,12141	-0,775124
2	2,09737	-0,869231	-0,627746	16	2,39112	-0,624557	-0,99642
3	-0,758911	-1,05065	-1,75392	17	0,832852	-0,994867	-0,221719
4	1,9122	0,694916	-1,497	18	-1,21348	0,841098	-0,115349
5	-0,588793	-1,33059	0,988339	19	-1,34228	-0,521533	-0,660601
6	-3,2628	-0,79846	-2,32884	20	-1,17953	1,76852	1,11453
7	1,39645	0,890392	-1,35216	21	-0,506322	-0,756821	0,804924
8	-1,31661	-1,03942	0,154484	22	-0,330975	0,731143	1,6931
9	0,588866	-1,58157	2,4824	23	0,855263	2,1104	0,69563
10	2,30046	0,663583	1,30484	24	0,267871	0,984196	-0,626199
11	0,0208466	-1,51179	0,883974	25	-0,394477	2,96994	-0,272128
12	0,047447	-0,674461	1,76735	26	-0,0791683	1,73783	0,0456837
13	-0,61562	0,488368	-0,855795	27	-2,23814	0,533994	1,15713
14	-0,393277	-1,76603	-0,174344				

**Tabla 53.** Correlación Ordinal de Spearman en granos de cacao primer muestreo (n=27)

	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>	<b>DR</b>	<b>ML</b>	<b>MD</b>
<b>Cd</b>	0,0788	-0,0930	0,1395	-0,1343	-0,0995	-0,2578	0,0730	0,3597
	0,6880	0,6353	0,4768	0,4934	0,6119	0,1886	0,7098	<b>0,0667</b>
<b>Cu</b>		-0,3139	0,3795	0,3132	0,0757	0,0180	0,1010	-0,1010
		<b>0,1094</b>	0,0530	<b>0,1103</b>	0,6995	0,9268	0,6066	0,6065
<b>Cr</b>			-0,1762	-0,3777	-0,2861	0,0465	-0,0601	-0,2410
			0,3690	<b>0,0541</b>	<b>0,1446</b>	0,8124	0,7594	0,2192
<b>Ni</b>				0,4753	0,0061	-0,1072	0,2288	0,3222
				<b>0,0154</b>	0,9752	0,5845	0,2433	<b>0,1004</b>
<b>Pb</b>					0,1862	-0,1417	0,0600	-0,0225
					0,3424	0,4698	0,7595	0,9087
<b>Zn</b>						-0,2300	-0,2214	0,1358
						0,2408	0,2590	0,4886
<b>DR</b>							0,1428	-0,2039
							0,4665	0,2986
<b>ML</b>								-0,0098
								0,9602

Correlación

Valor-P

DR: distancia del Rio Tuy; ML: longitud de la mazorca ; MD: diámetro de la mazorca

### A.5. 3 Segundo Muestreo

**Tabla 54.** Análisis de Componentes Principales en granos de cacao, segundo muestreo (n=7)

<b>Componente Número</b>	<b>Eigenvalor</b>	<b>Porcentaje de Varianza</b>	<b>Porcentaje Acumulado</b>
1	4,53511	50,390	50,390
2	3,18437	35,382	<b>85,772</b>
3	0,819969	9,111	94,883
4	0,303229	3,369	98,252
5	0,12947	1,439	99,691
6	0,0278468	0,309	100,000
7	2,13546E-16	0,000	100,000
8	1,30695E-16	0,000	100,000
9	0,0	0,000	100,000

**Tabla 55.** Pesos de los Componentes en granos de cacao, segundo muestreo (n=7)

	Componente	
	1	2
<b>Cd</b>	0,457671	-0,0560171
<b>Cu</b>	0,357209	0,334976
<b>Cr</b>	0,325482	-0,362723
<b>Ni</b>	0,419864	-0,137678
<b>Pb</b>	0,367538	-0,304877
<b>Zn</b>	0,274052	0,404526
<b>DR</b>	-0,013703	-0,440232
<b>ML</b>	-0,409047	-0,118519
<b>MD</b>	-0,0549322	-0,519316

DR: distancia del Rio Tuy; ML: longitud de la mazorca;  
MD: diametro de la mazorca

**Tabla 56.** Componentes Principales en granos de cacao, segundo muestreo (n=7)

Fila	Componente	
	1	2
1	1,67008	2,44636
2	1,3829	0,373571
3	-2,5871	0,189101
4	-0,154265	1,3254
5	-1,0974	0,329291
6	-2,27911	-2,01097
7	3,06489	-2,65276

**Tabla 57.** Correlación Ordinal de Spearman en granos de cacao, segundo muestreo (n=7)

	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>	<b>DR</b>	<b>ML</b>	<b>MD</b>
<b>Cd</b>	0,7143	0,3929	0,8214	0,6429	0,4643	-0,1071	-0,8895	-0,1482
<b>Cu</b>	<b>0,0802</b>	0,3359	<b>0,0442</b>	<b>0,1153</b>	0,2554	0,7930	<b>0,0293</b>	0,7165
<b>Cr</b>		0,1071	0,6786	0,5714	0,7857	-0,6429	-0,7783	-0,6671
<b>Cr</b>		0,7930	0,0965	<b>0,1616</b>	<b>0,0543</b>	<b>0,1153</b>	<b>0,0566</b>	<b>0,1022</b>
<b>Cr</b>			0,4286	0,5357	-0,0714	0,4286	-0,4077	0,5559
<b>Ni</b>			0,2938	<b>0,1894</b>	0,8611	0,2938	0,3180	<b>0,1733</b>
<b>Ni</b>				0,8929	0,3571	0,0000	-0,6671	-0,2224
<b>Pb</b>				<b>0,0287</b>	0,3817	1,0000	0,1022	0,5860
<b>Pb</b>					0,1071	-0,0357	-0,4818	-0,1112
<b>Zn</b>					0,7930	0,9303	0,2379	0,7853
<b>Zn</b>						-0,4286	-0,7412	-0,7412
<b>DR</b>						0,2938	<b>0,0694</b>	<b>0,0694</b>
<b>DR</b>							0,1482	0,6671
<b>ML</b>							0,7165	0,1022
<b>ML</b>								0,3077
<b>MD</b>								0,4510

Correlación

Valor-P

DR: distancia del Rio Tuy; ML: longitud de la mazorca ; MD: diámetro de la mazorca

## Apéndice 6: Relación granos de cacao con el pH del suelo

**Tabla 58.** Análisis de Componentes Principales de la relación de granos de cacao con el pH del suelo (n=15)

Componente Número	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	3,93622	39,362	39,362
2	2,34209	23,421	62,783
3	1,58602	15,860	<b>78,643</b>
4	0,855659	8,557	87,200
5	0,562168	5,622	92,822
6	0,349868	3,499	96,320
7	0,180715	1,807	98,127
8	0,107327	1,073	99,201
9	0,0753357	0,753	99,954
10	0,00459962	0,046	100,000

**Tabla 59.** Pesos de los Componentes de la relación de granos de cacao con el pH del suelo (n=15)

	Componente		
	1	2	3
<b>pH</b>	0,45445	0,129823	-0,135436
<b>Cd</b>	-0,436434	0,19632	0,0769657
<b>Cu</b>	-0,416328	0,0989158	-0,307406
<b>Cr</b>	0,156834	0,496512	0,333008
<b>Ni</b>	0,146604	0,548566	0,023137
<b>Pb</b>	-0,0373921	0,499162	0,0200129
<b>Zn</b>	-0,308284	0,0787121	-0,520676
<b>ML</b>	0,126049	-0,363165	0,327797
<b>MD</b>	-0,288545	0,0106992	0,546074
<b>DR</b>	-0,433588	-0,00315006	0,304392

**Tabla 60.** Componentes Principales de la relación de granos de cacao con el pH del suelo (n=15)

Fila	Componente			Fila	Componente		
	1	2	3		1	2	3
1	1,1542	0,66968	-2,6022	9	-1,68948	-0,598969	-0,306503
2	2,08749	1,47552	-0,369155	10	-1,21664	-1,2819	-1,4017
3	2,81674	-2,26388	0,67839	11	-0,332999	1,14074	-0,281246
4	1,96166	-0,279389	-1,44481	12	-1,49641	-0,244241	0,242493
5	1,50703	-1,34745	-0,364876	13	-3,27098	0,738348	-0,25439
6	2,2717	-1,34089	2,10471	14	-2,64742	-0,516552	0,23624
7	1,49513	4,11683	1,27685	15			
8	-1,10756	0,17241	0,485504	16	-1,53245	-0,440254	2,00069

**Tabla 61.** Correlación Ordinal de Spearman de la relación de granos de cacao con el pH del suelo (n=15)

	<b>Cd</b>	<b>Cu</b>	<b>Cr</b>	<b>Ni</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>	<b>ML</b>	<b>MD</b>	<b>DR</b>
<b>pH</b>	-0,6565 <b>0,0140</b>	-0,5832 <b>0,0291</b>	0,3883 0,1462	0,2679 0,3161	0,2274 0,3949	-0,2901 <b>0,2778</b>	-0,0485 0,8559	-0,5527 <b>0,0386</b>	-0,9070 <b>0,0007</b>
<b>Cd</b>		0,6036 <b>0,0239</b>	0,0358 0,8934	0,0447 0,8671	0,1752 0,5122	0,4987 <b>0,0621</b>	-0,3474 0,1936	0,6924 <b>0,0096</b>	0,7750 <b>0,0037</b>
<b>Cu</b>			-0,3850 0,1498	0,0877 0,7429	0,2377 0,3738	0,6667 <b>0,0126</b>	-0,2359 0,3774	0,2083 0,4358	0,5107 <b>0,0560</b>
<b>Cr</b>				0,4027 0,1319	0,1837 0,4919	-0,3351 0,2099	-0,2191 0,4123	0,0614 0,8184	-0,0734 0,7836
<b>Ni</b>					0,4575 <b>0,0869</b>	-0,1808 0,4986	-0,2363 0,3766	-0,1812 0,4978	-0,2272 0,3953
<b>Pb</b>						0,0662 0,8044	-0,2736 0,3059	-0,2176 0,4155	-0,0232 0,9307
<b>Zn</b>							-0,3377 0,2064	0,0878 0,7426	0,2252 0,3994
<b>ML</b>								0,1403 0,5996	-0,0768 0,7738
<b>MD</b>									0,6120 <b>0,0220</b>

Correlación

Valor-P

DR: distancia del Rio Tuy; ML: longitud de la mazorca ; MD: diámetro de la mazorca