

Quantification of cadmium in samples of Venezuelan *Theobroma cacao* almonds

Edilmar Padilla ^a, Luis Alberto Cedeño-Sares^d, José Domínguez^a, Fausto Baldemar-Dután^d Augusto Rodríguez^c, Edgar Tinoco^d & Lenys Fernández^b

^a Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela. jrdomin@usb.ve, EpadillaUSBV@hotmail.com

^b Escuela de Ciencias Químicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. lmfernandez@puce.edu.ec

^c Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (Grupo de Conversión y Almacenamiento de Energía), La Plata, Argentina. augustorodriguez@inifta.unlp.edu.ar

^d Facultad de Ciencias Químicas y de la Salud, Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador. lcedeno@utmachala.edu.ec, etinoco@utmachala.edu.ec, fdutan@utmachala.edu.ec

Received: October 15th, 2024. Received in revised form: March 3th, 2025. Accepted: March 12th, 2025.

Abstract

Since the European Union regulations on the maximum permissible content of heavy metals came into force in 2019, there has been a growing interest in quantification these metals in Venezuelan cocoa. In the present study, Cd was quantified in nine samples of cocoa beans from different areas of the national territory, analyzing the shell and nib separately. Atomic absorption spectroscopy with flame atomization using a continuous source spectrophotometer in fast sequential mode was utilized. A sample digestion process was optimized through the implementation of a factorial design. Measurements were evaluated by calculating the percentage recovery for inter-day and intra-day precision determination. The cadmium concentration in the samples ranged from 1.4 to 7.2 mg kg⁻¹, exceeding the European Union's established limit of 0.6 mg kg⁻¹.

Keywords: cadmium; food safety; heavy metals; Venezuelan cocoa.

Cuantificación de cadmio en muestras de almendras *Theobroma cacao* venezolano

Resumen

Desde la entrada en vigencia de la normativa de la Unión Europea en 2019 sobre los límites máximos permitidos de metales pesados, ha aumentado el interés por la cuantificación de estos elementos en el cacao venezolano. En este estudio, se determinó la concentración de cadmio (Cd) en nueve muestras de granos de cacao provenientes de distintas regiones del país, analizando por separado la cáscara y el nib. Se optimizó un proceso de digestión de muestras mediante un diseño factorial y se empleó para la cuantificación espectroscopia de absorción atómica con atomización por llama, utilizando un espectrofotómetro de fuente continua en modo secuencial rápido. La precisión del método se evaluó a través del cálculo del porcentaje de recuperación en determinaciones inter-diarias e intra-diarias. Los resultados arrojaron concentraciones de cadmio en un rango de 1,4 a 7,2 mg kg⁻¹, superando el límite establecido por la normativa europea de 0,6 mg kg⁻¹.

Palabras clave: cadmio; cacao venezolano; seguridad alimentaria; metales pesados.

1. Introducción

El cacao, es un fruto tropical necesario e insustituible para la producción de chocolate, que proviene del árbol "cacaotero" perteneciente a la familia *Malvaceae* [1,2]. Su nombre científico, *Theobroma cacao*, deriva del griego

"*Theobroma*", que significa "alimento de los dioses", mientras que la palabra "cacao" es una adaptación del *nahua* "cacáhua", que significa fruto.

Debido a sus múltiples beneficios para la salud, el cacao ha generado un gran interés global, siendo reconocido como un superalimento [1,3]. Entre estos beneficios se destacan los

How to cite: Padilla, E., Cedeño-Sares, L.A., Domínguez, J., Dután, F.B., Rodríguez, A., Tinoco, E., and Fernández, L., Cuantificación de cadmio en muestras de almendras *Theobroma cacao* venezolano. DYNA, 92(235), pp. 134-141, January - March, 2025.

reportados por Vicentim y Hassoun [4,5], quienes encontraron que el cacao puede actuar como un agente terapéutico en el tratamiento de lesiones vasculares causadas por la diabetes mellitus. Además, Baharum et al. [6] demostraron la eficacia de los compuestos bioactivos del cacao en procesos fisiológicos y fisiopatológicos [7]. El cacao es rico en antioxidantes como flavonoides, catequinas, epicatequina, endorfinas, procianidinas y polifenoles [8], los cuales ayudan a reducir radicales libres, prevenir enfermedades infecciosas y autoinmunes, contribuyen a regular la presión sanguínea y tienen propiedades anticancerígenas. Estudios en mujeres de edad avanzada han mostrado que el chocolate puede mejorar la osteoporosis [9,10].

El creciente interés en el consumo de chocolate ha incrementado la demanda mundial de cacao [11], impulsada por el mercado global de productos de confitería. Según la Organización Internacional del Cacao, la oferta anual de cacao alcanzó los 3.8 millones de toneladas en 2015/16, siendo Costa de Marfil, Ghana e Indonesia los principales productores, representando el 70,7 % de la producción mundial [12]. Los principales consumidores de productos derivados del cacao se encuentran en Europa, Estados Unidos, Australia y Japón [13]. En Venezuela, se está desarrollando la denominación de origen para certificar la calidad específica del cacao, destacándose el "Cacao de Chuao" como la primera denominación de origen reconocida por el Servicio Autónomo de la Propiedad Intelectual (SAPI) en el 2000.

Se han detectado concentraciones elevadas de metales pesados en muestras de cacao y sus derivados, lo que ha llevado al establecimiento de controles estrictos sobre los niveles permitidos [14-16]. En Venezuela, aún no se han realizado investigaciones exhaustivas sobre concentración de metales pesados en el cacao, por lo que, determinar estas concentraciones es crucial dado su valor internacional. En la presente investigación se cuantificó cadmio (Cd) en almendras de cacao venezolano mediante espectroscopia de absorción atómica, abarcando tanto el nib como la cáscara de semillas fermentadas. Se seleccionó el análisis de Cd debido a los graves daños que este metal puede causar en la salud humana, incluso en niveles traza, tales como alteraciones metabólicas, neurológicas, mentales y genéticas [17]. La ingesta de Cd se produce mayormente a través de alimentos como paté, champiñones, mariscos, mejillones, algas secas y cacao. Estudios previos han mostrado que el chocolate puede contener trazas de este metal pesado. Yanus et al. [9] encontraron una relación lineal entre el contenido de metales pesados en el chocolate procesado y los sólidos de cacao. Por otro lado, Chávez et al. [10] estudiaron la determinación de Cd en el sur de Ecuador en muestras de suelo y plantas de cacao, atribuyendo la contaminación a actividades antropogénicas.

2. Metodología

Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos: ácido nítrico (HNO_3), Fisher Chemical, Ottawa, Canada, ACS certificate, CAS# CAS 7697-37-2, PubChem CID: 944; peróxido de hidrógeno (H_2O_2), Fisher Chemical, Ottawa, Canada, Certified ACS, CAS# 7722-84-1, PubChem CID: 784;

ampolla marca Titrisolde CdCl_2 para preparar solución madre de 1000 ppm de Cd, agua nanopura de 18 M Ω , gases: aire y acetileno.

Materiales y equipos

Papel de filtro marca Whatman Nro. 42, pipetas automáticas de 10-100 μL marca Dragon Lab, pipeta de 100-1000 μL marca accumax A modelo AV-600 y pipeta de 1-10 mL marca Socorex modelo Acura 835, balanza analítica de cuatro cifras marca A&D modelo GR-120, digestor de microondas marca Berghof modelo Speedwavefour, baño de ultrasonido marca Cole-Parmer modelo 8854, espectrofotómetro de absorción atómica marca Analytik Jena modelo contrAA 700 y destilador Marca Barnstead.

Muestras

Para obtener una variabilidad adecuada se seleccionaron tres regiones diferentes de producción de cacao en Venezuela: Miranda, Ocumare y Carúpano. Dentro de cada región, se seleccionaron dos plantaciones de cacao diferentes. De cada plantación, se recolectó al azar 1 kg de semillas de cacao fermentadas, tomando muestras de distintas áreas dentro de cada plantación. En la Tabla 1 se listan el tipo y procedencia de las muestras analizadas.

Tratamiento de muestras

Descascarillado

Se removió manualmente la cáscara que recubre la almendra tostada y fermentada de cacao. Se almacenaron por separado las cáscaras y el nib, en bolsas de plástico con cierre hermético.

Homogeneización de las muestras

Dado el origen natural y la variabilidad inherente de las muestras, se llevó a cabo un proceso de homogeneización para garantizar la representatividad y reproducibilidad de los resultados analíticos. Para ello, las almendras de *Theobroma cacao* fueron sometidas a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 48 horas para reducir la humedad residual y evitar interferencias en la cuantificación de cadmio. Posteriormente, las almendras secas se trituraron utilizando un mortero de cerámica y un pistilo hasta obtener un material de granulometría homogénea. Para minimizar la

Tabla 1.
Tipos de muestras y procedencia.

#	Tipo de muestra	Procedencia
1	Híbridos internacionales	Padrón. Troncal 9. Estación experimental Miranda
2	Carenero Superior	Barlovento, comunidad de Curiepe-Mango de Ocoita. Estado Miranda
3	Cacao de Cumboto	Central de beneficio 6 de julio. Ocumare de La costa. Edo. Aragua
4	Sur del Lago	UPS Pedregal y Palmira. Estado Mérida.
5	Ocumare 61	Carúpano, Estado Sucre
6	Carenero	Carúpano, Estado Sucre
7	Sur del Lago	Carúpano, Estado Sucre
8	Canoabo	Carúpano, Estado Sucre
9	Rio Caribe Superior	Carúpano, Estado Sucre

Fuente: Los autores.

contaminación cruzada, el mortero y el pistilo se limpiaron rigurosamente entre cada muestra con una solución de HNO_3 al 10 % (v/v) y se enjuagaron con agua ultrapura. El polvo obtenido se tamizó utilizando un tamiz de malla 250 μm para garantizar la uniformidad en el tamaño de partícula. Las muestras trituradas se almacenaron en bolsas de polietileno estériles y herméticas, protegidas de la luz y la humedad hasta su posterior digestión y análisis.

Digestión por microondas

Se pesaron 0,500 g de muestra y se ingresaron a un tubo de teflón, utilizando un embudo de vidrio diseñado especialmente para garantizar que la muestra quede depositada en su totalidad en la parte inferior del tubo y no en las paredes del mismo. La digestión del material orgánico se realizó utilizando HNO_3 y H_2O_2 . El proceso de digestión con HNO_3 se asocia a la siguiente reacción: $(\text{CH}_2)_n + 2\text{HNO}_3 \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NO} + 2\text{H}_2\text{O}$ y la reacción de descomposición con H_2O_2 , para aumentar el potencial de oxidación y suprimir la formación de óxidos de nitrógeno (de color amarillo) a: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Se utilizaron las siguientes condiciones: envases de teflón de 60 mL, modelo DAP-60+, presión 40 bar (580 psi), temperatura 230 °C, 500 mg de muestra y 5 mL de ácido; además, de un elemento de seguridad de aluminio como indicador de fuga de gases. A continuación, el tubo se introdujo en el digestor por microondas y se inició el programa de digestión.

Digestión por ultrasonido

Para la digestión asistida por ultrasonido, se pesó con precisión 1,0 g de muestra homogeneizada y se transfirió a un tubo de digestión de vidrio, el cual estaba equipado con un condensador de 50 cm de altura para evitar la pérdida de volátiles. Los tubos de digestión se colocaron en una estructura metálica dentro del baño de ultrasonidos (Fig. 1), asegurando una distribución uniforme de la energía ultrasónica. Una vez correctamente ubicados, se cerraron con sus respectivos condensadores, y se activó el flujo continuo de agua para la refrigeración del sistema. La digestión por ultrasonido se llevó a cabo aplicando una frecuencia ultrasónica de 40 kHz con una potencia de 120 W durante un tiempo previamente optimizado en el diseño experimental. Este proceso favorece la disrupción de la matriz orgánica y la liberación de metales pesados en la solución, reduciendo el tiempo y la severidad de las condiciones en comparación con otros métodos de digestión.

Filtrado de la muestra

Luego de la digestión de las muestras, las soluciones resultantes se filtraron para eliminar cualquier material particulado que pudiera obstruir los capilares del espectrofotómetro de absorción atómica modelo contrAA 700 (Analytik Jena). Para ello, se utilizó filtración por gravedad mediante embudos de vidrio y papel de filtro de celulosa de porosidad media (Whatman N° 42). Las soluciones filtradas se recolectaron en matraces aforados de 25 mL en el caso de las muestras digeridas por microondas y de 50 mL para aquellas digeridas por ultrasonido. Posteriormente, las soluciones se almacenaron en frascos de polietileno de alta densidad (HDPE) y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su análisis.



Figura 1. Montaje de digestión con ultrasonido.

Fuente: Los autores.

Diseño factorial

Para la optimización de las condiciones de digestión, se diseñó un experimento factorial completo, en el que se evaluaron los efectos de tres variables principales: temperatura, tiempo de digestión y proporción de reactivos. Como muestra de control, se emplearon híbridos internacionales de *Theobroma cacao*, cuya composición química es bien caracterizada en estudios previos. En las Tablas 2 y 3 se detallan los niveles de cada variable y las condiciones experimentales utilizadas para cada método de digestión. Este diseño experimental permitió identificar las condiciones óptimas para maximizar la eficiencia de digestión y minimizar la degradación de la muestra, asegurando una recuperación cuantitativa del cadmio presente en la matriz de cacao.

Tabla 2.
Diseño factorial para la digestión por microondas.

Digestión	T/ °C	t/ min	$\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$
1	190	30	6:0
2	190	45	6:0
3	190	30	4:3
4	190	45	4:3
5	170	30	6:0
6	170	45	6:0
7	170	30	4:3
8	170	45	4:3

Fuente: Los autores.

Tabla 3.
Diseño factorial para la digestión por ultrasonido.

Digestión	T/°C	t/ min	HNO ₃ :H ₂ O ₂
1	45	60	6:0
2	45	60	4:3
3	60	120	6:0
4	60	120	4:3
5	60	60	6:0
6	60	60	4:3
7	45	120	6:0
8	45	120	4:3

Fuente: Los autores.

La exactitud de las medidas, se reportan como porcentajes de recuperación: $\% R = \frac{\text{valor experimental}}{\text{valor teórico}} \times 100$; utilizando una cantidad conocida de patrones Cd. Para la digestión por ultrasonido a las muestras del nib se añadieron 0,025 mg de Cd y a las de cáscara 0,020 mg. Para la digestión por microondas se añadieron 0,012 mg de Cd a las muestras de nib y 0,010 mg a las de cáscara. El criterio aceptado fue valores de % R entre 90 -105 % [19-21].

Para el análisis de repetibilidad se utilizó la muestra etiquetada con el número 1 en la Tabla 2. El estudio se realizó en un día a las siguientes horas: 8:30 am, 10:30 am, 1:30 pm, 3:30 pm y 5:30 pm. En cuanto a las mediciones inter-diarias se realizaron en un intervalo de siete días, medidas diarias entre las 10:30 am y las 11:00 am y se evaluaron parámetros adicionales de temperatura, humedad y precipitaciones; para evaluar la relación entre las medidas y estos parámetros.

Cuantificación de cadmio por espectroscopia de absorción atómica de llama

Para las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro contrAA700 de *Analitik Jena* de alta resolución con fuente continua. Las muestras se inyectaron al equipo mediante un auto muestreador y los análisis de Cd se realizaron de modo secuencial rápido y simultáneo. Para la construcción de curvas de calibración, Fig. 2, se prepararon patrones de Cd de 50 mL, (0,05 a 1,5 mg L⁻¹) a partir de soluciones madre de 1000 mg L⁻¹. La longitud de onda de trabajo, de mayor sensibilidad, fue de 228 nm. Se utilizó acetileno como combustible a un flujo de 50 L h⁻¹ y aire como oxidante a 470 L h⁻¹. Adicionalmente, se programó el equipo para que realizara seis réplicas para cada medida. El límite de detección fue calculado directamente por el software del equipo contrAA700, el cual suministra los datos automáticamente a partir de la curva de calibración realizada. El límite de detección obtenido fue de 0,0279 mg L⁻¹.

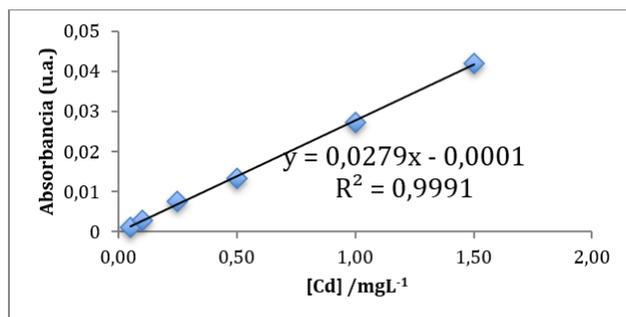


Figura 2. Curva de calibración.
Fuente: Los autores.

3. Resultados y Discusión

Efecto del tipo de digestión en la cuantificación de cadmio

En las Tablas 4 y 5 se presentan las concentraciones de Cd determinadas en muestras de híbridos internacionales de *Theobroma cacao*, obtenidas mediante cada uno de los procesos de digestión, según las condiciones establecidas en el diseño factorial.

Mediante digestión de las muestras por microondas, la concentración máxima de Cd en el nib fue de $4,9 \pm 0,1$ mg kg⁻¹, la cual se obtuvo realizando la digestión con una relación 4:3 (mL) de HNO₃:H₂O₂, respectivamente; mientras la concentración máxima de Cd obtenida en la cáscara fue de $8,60 \pm 0,03$ mg kg⁻¹, utilizando HNO₃:H₂O₂ 6:0 (mL); ambos resultados obtenidos a 170 °C y 45 min. De acuerdo a la observación experimentales, en las digestiones realizadas con proporción de HNO₃:H₂O₂ de 6: 6 (mL) se generaron gases que aumentaron considerablemente la presión en el tubo de digestión, lo que resultó en el rompimiento del plástico de seguridad. Por otro lado, por digestión con baño de ultrasonido se obtuvieron concentraciones de Cd entre 2,6-3,6 mg kg⁻¹ para el nib y 5,6-7,0 mg kg⁻¹, utilizando una proporción 4:3 (mL) de HNO₃:H₂O₂ por 120 minutos y 60 °C.

Con ambos métodos de digestión las mayores concentraciones de Cd se obtuvieron con una proporción 4:3 (mL) de HNO₃:H₂O₂. Sin embargo, para la digestión por ultrasonido se necesitó de mayor tiempo y temperatura. Los resultados mostrados son soportados por los valores de % R (Tabla 6), donde con digestión por ultrasonido se obtuvo un menor % R, entre 73-93 %, los cuales están por debajo del rango aceptado.

Tabla 4.
Concentración de Cd en las muestras de híbridos internacionales de *Theobroma cacao*, de acuerdo al diseño factorial para digestión por microondas.

	HNO ₃ /mL	H ₂ O ₂ /mL	H ₂ O/ mL	T /°C	t/mi n	Cd] /mg Kg ⁻¹
Nib	6	0	6	190	30	2,8±0,1
Cáscara	6	0	6	190	30	6,6±0,1
Nib	4	3	5	190	30	2,1±0,2
Cáscara	4	3	5	190	30	6,4±0,4
Nib	4	3	5	190	45	3,6±0,1
Cáscara	4	3	5	190	45	7,5±0,1
Nib	6	0	6	190	45	3,471±0,003
Cáscara	6	0	6	190	45	7,06±0,04
Nib	4	3	5	170	45	4,9±0,1
Cáscara	4	3	5	170	45	8,3±0,2
Nib	6	0	6	170	45	4,4±0,2
Cáscara	6	0	6	170	45	8,60±0,03
Nib	6	0	6	170	30	4,42±0,05
Cáscara	6	0	6	170	30	8,45±0,04
Nib	4	3	5	170	30	4,7±0,2
Cáscara	4	3	5	170	30	8,04±0,04

Fuente: Los autores.

Tabla 5.

Concentración de Cd en las muestras de híbridos internacionales de *Theobroma cacao*, de acuerdo al diseño factorial para digestión por ultrasonido.

	HNO ₃ /mL	H ₂ O ₂ /mL	H ₂ O /mL	T/° C	t/mi n	[Cd]/mg Kg ⁻¹
Nib	12	0	12	45	60	2,6±0,1
Cáscara	12	0	12	45	60	6,86±0,05
Nib	8	6	10	45	60	2,84±0,06
Cáscara	8	6	10	45	60	5,6±0,1
Nib	12	0	12	60	120	2,82±0,06
Cáscara	12	0	12	60	120	6,7±0,2
Nib	8	6	10	60	120	3,6±0,2
Cáscara	8	6	10	60	120	7,01±0,06
Nib	8	6	10	60	60	3,1±0,1
Cáscara	8	6	10	60	60	5,81±0,04
Nib	12	0	12	60	60	3,11±0,01
Cáscara	12	0	12	60	60	5,8±0,1
Nib	8	6	10	45	120	2,6±0,2
Cáscara	8	6	10	45	120	6,2±0,1
Nib	12	0	12	45	120	3,01±0,08
Cáscara	12	0	12	45	120	5,8±0,1

Fuente: Los autores.

Tabla 6.

Porcentaje de recuperación para cada método de digestión.

Método	[Cd] / %	
	Nib	Cáscara
Digestión con ultrasonido	93 ± 1	79,6 ± 0,9
Digestión con microondas	96 ± 2	94 ± 1

Fuente: Los autores.

Tabla 7.

Resultados del estudio de repetibilidad intra-día.

Hora	Absorbancia (Nib)	Absorbancia (Cáscara)	T/°C	Humedad /%	Presión(mbar)
8:30 am	0,0021±0,0002	0,0048±0,0002	23,1	83	1020,6
10:30 am	0,00226±0,00001	0,0049±0,0002	23,8	80	1020
1:30 pm	0,00217±0,00002	0,0049±0,0003	24,7	64	1017,7
3:30 pm	0,0021±0,0001	0,0046±0,0002	25,1	62	1015,7
5:30 pm	0,00222±0,00009	0,0049±0,0003	24,9	85	1015,9
Promedio	0,00222	0,0048			
Desviación estándar	0,00007	0,0001			
Coefficiente de variación (%)	3,29	2,71			

Fuente: Los autores.

Tabla 8.

Resultados del estudio de precisión inter-diaria.

Fecha	Absorbancia (Nib)	Absorbancia (Cáscara)	T/°C	Humedad /%	Presión/mbar
27/09/2016	0,00221±0,00005	0,00461±0,00006	23,8	80	1020
28/09/2016	0,0020±0,0002	0,0042±0,0001	24,1	76	1019,8
04/10/2016	0,00221±0,00007	0,0040±0,0003	22,9	69	1019,1
07/10/2016	0,00215±0,00005	0,0043±0,0002	23,7	71	1015,1
10/20/2016	0,00217±0,00009	0,0045±0,0002	24,2	79	1015,8
Promedio	0,00215	0,0043			
Desviación estándar	0,00008	0,0002			
Coefficiente de variación	3,79	5,35			

Fuente: Los autores.

Dado que el sistema de digestión por ultrasonido consiste en un tubo con un sistema de condensación (Fig. 1), se descartó la posible pérdida de analito por volatilización durante la digestión. Por otro lado, debido al tamaño del tubo y el aforo para la solución de 50 mL se entorpece el proceso de trasvasado y lavado, por lo cual se concluyó posible pérdida de analito puede ocurrir en esta etapa.

En el caso de la digestión con microondas los % R estuvieron entre 94-104 %, valores dentro del rango de aceptación. Estos resultados indican que el horno de microondas utilizado para la digestión de la muestra mantiene en solución la totalidad del analito y garantiza los resultados con mayor exactitud, por lo que fue seleccionado como el método de digestión para los ensayos presentados en las próximas secciones (HNO₃:H₂O₂ 4:3 (mL), 170 °C y 45 min).

Evaluación de la precisión inter-día e intra-día de las medidas

Utilizando digestión por microondas, se evaluó la repetibilidad inter-día e intra-día de las absorbancias obtenidas. Para la repetibilidad intra-día se realizaron medidas de la misma muestra un mismo día a distintas horas. En la Tabla 7, se reportan las absorbancias promedio y las condiciones ambientales de temperatura, presión y humedad del laboratorio donde se realizaron las medidas. Se obtuvo en promedio una absorbancia de 0,00222 para el nib y 0,0048 para la cáscara; con un coeficiente de variación promedio de 3 % para ambas muestras. Valores de coeficientes de variación menores de 1 % en un análisis de repetibilidad son considerados aceptables según la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) [22], por lo que se procedió a evaluar los posibles efectos externos que pudieran generar diferencia entre las mediciones.

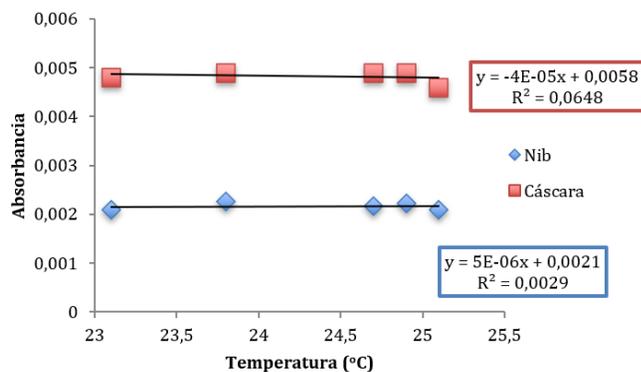


Figura 3. Evaluación del efecto de la temperatura ambiente en las mediciones de absorbancia en el estudio intra-diarario.

Fuente: Los autores.

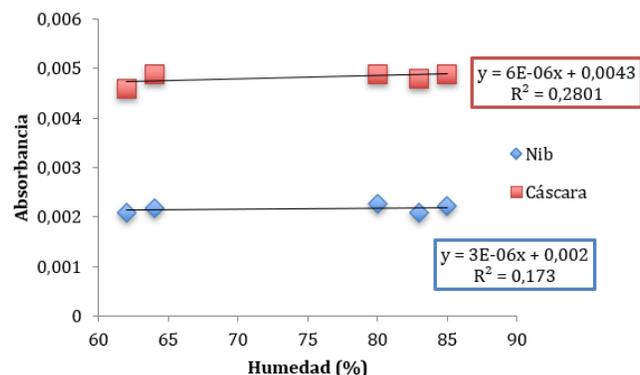


Figura 4. Evaluación del efecto de la humedad en las mediciones de absorbancia en medidas intra-diarario.

Fuente: Los autores.

La relación entre la temperatura y las medidas de absorbancia se presenta en la Fig. 3, donde se puede observar un coeficiente de determinación R^2 menores de 0,1 con pendientes que tienden a cero, por lo que las mediciones realizadas son prácticamente independientes de la temperatura. Igualmente, en las Figs. 4 y 5, se puede observar que no hay relación de dependencia entre las absorbancias medidas y las variables externas presión y humedad. De acuerdo a estos resultados se consideró que las mediciones son bastante precisas y las leves variaciones detectadas no tienen relación alguna con variables como la temperatura, presión o humedad del ambiente.

Bajo el mismo procedimiento descrito se realizaron las mediciones de absorbancia en la solución de una única muestra variando en diferentes días. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Los valores establecidos como aceptables por la ICH es un coeficiente de variación promedio por debajo de 2 %, para el análisis de precisión intermedia. En la presente investigación se obtuvo un coeficiente de variación promedio de 4,6 % por lo que se procedió a evaluar los posibles efectos externos que generaron las diferencias en las medidas de absorbancia. Los resultados (no mostrados), indicaron que no hay efecto apreciable entre las variables estudiadas y la absorbancia.

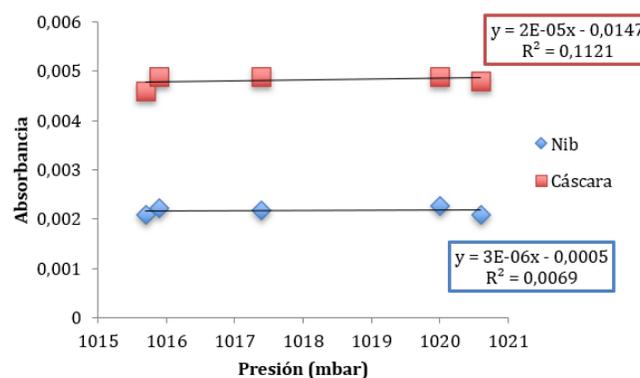


Figura 5. Evaluación del efecto de la presión en las mediciones de absorbancia en estudio intra-diarario.

Fuente: Los autores.

Tabla 8. Resultados del estudio de precisión inter-diarario.

Fecha	Absorbancia (Nib)	Absorbancia (Cáscara)	T / °C	Humedad / %	Presión/mbar
27/09/2016	0,00221±0,00005	0,00461±0,00006	23,8	80	1020
28/09/2016	0,0020±0,0002	0,0042±0,0001	24,1	76	1019,8
04/10/2016	0,00221±0,00007	0,0040±0,0003	22,9	69	1019,1
07/10/2016	0,00215±0,00005	0,0043±0,0002	23,7	71	1015,1
10/20/2016	0,00217±0,00009	0,0045±0,0002	24,2	79	1015,8
Promedio	0,00215	0,0043			
Desviación estándar	0,00008	0,0002			
Coefficiente de variación	3,79	5,35			

Fuente: Los autores.

Determinación de cadmio en muestras de *Theobroma cacao* venezolano

En la Tabla 9 se reportan los resultados obtenidos de concentración de Cd para cada muestra analizada. No se

detectó Cd en las muestras provenientes de Cumboto de la región Ocumare de la Costa y la variedad Ocumare 61 procedente de la población de Carúpano, mientras que en las otras muestras la presencia de Cd fue evidente.

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en los niveles de Cd entre las siete muestras de *Theobroma cacao* en las que se detectó el metal ($p < 0,01$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de Cd entre nib y cáscara en las muestras de Carenero – Carúpano y Sur del Lago – Carúpano ($p = 0,2105$ y $p = 0,1034$, respectivamente). En contraste, en las muestras provenientes de las demás regiones sí se encontraron diferencias significativas en la concentración de Cd entre nib y cáscara.

Los resultados presentados en la Fig. 6, indican que la muestra con mayor concentración de Cd fue la proveniente de Padrón en la estación experimental Miranda. En todas las muestras donde se detectó Cd la concentración se encuentra por encima de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ (valor indicado por la línea verde sobre el gráfico), límite permisible fijado por Unión Europea y la Organización Internacional de Cacao durante el “Taller internacional sobre el cadmio en productos de cacao y chocolate” en el año 2019. Además, se encontró que la mayor concentración de Cd en las muestras estudiadas está en la cáscara; resultado contrario a lo encontrado por Chávez et al. [18], quienes reportaron que en muestras de cacao proveniente de distintas zonas de Ecuador la mayor concentración de Cd se encontró en el nib.

Tabla 9. Concentración de cadmio en las diferentes muestras. N=6.

#	Muestra	[Cd] en nib (mg Kg ⁻¹)	[Cd] en cáscara (mg Kg ⁻¹)
1	Híbridos internacionales-Miranda	3,6±0,3	7,2±0,2
2	Carenero superior-Miranda	2,6±0,5	5,7±0,2
3	Cumboto-Ocumare	N/D	N/D
4	Sur de lago-Mérida	1,7±0,2	2,0±0,3
5	Ocumare 61- Carúpano	N/D	N/D
6	Carenero- Carúpano	2,86±0,07	3,0±0,1
7	Sur del lago- Carúpano	2,0±0,3	2,0±0,1
8	Canoabo-Carúpano	1,7±0,1	2,46±0,04
9	Río Caribe Superior- Carúpano	1,40±0,08	2,3±0,2

*N/D = no detectado.

Fuente: Los autores.

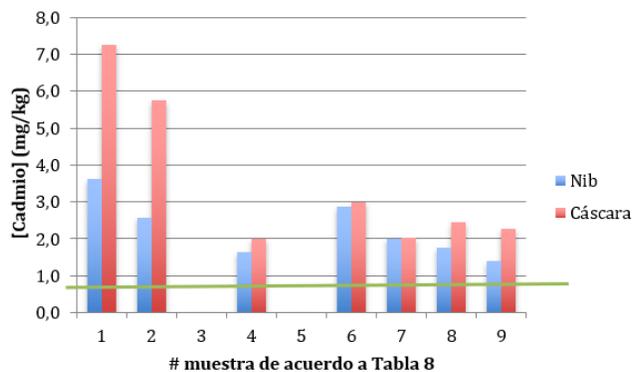


Figura 6. Resultados obtenidos para las diferentes muestras.

Fuente: Los autores.

La mayor concentración de Cd en la cáscara puede ser indicador de fuente de contaminación externa durante el proceso de fermentación, secado o tostado; sin embargo, los valores altos encontrados en el nib no descartan la posibilidad que la contaminación ocurra durante el crecimiento de la planta y, por lo tanto, el metal provenga de suelo o agua contaminada [24]. Por otro lado, se indago sobre posibles fuentes de contaminación en la zona de la muestra con mayor concentración de Cd y no se encontraron, por lo cual sería valioso profundizar en estudios de suelo y agua.

Un resultado relevante en la presente investigación, fue el obtenido en las muestras etiquetadas en la Tabla 9 como 5,6,7,8 y 9, las cuales son diferentes tipos de cacao que provienen de una misma plantación de la población de Carúpano; en estas muestras la concentración de Cd varía entre 1,4 y 2,9 mg kg^{-1} sin embargo, existe una de ellas (muestra 5) cuya concentración de Cd no pudo ser detectada y se asumió que la concentración se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica. En esta plantación los diferentes tipos de cacao se encuentran geográficamente separados en terrenos bien delimitados por lo que, realizar estudios de suelos aportaría valiosa información.

La presencia de Cd en las almendras de cacao es un aspecto que se ha estudiado alrededor del mundo en países productores de cacao; por ejemplo, se han detectado altas concentraciones de Cd en muestras provenientes de Ecuador, Malasia y Perú [14], reportes que coinciden con los resultados obtenidos en esta investigación.

1. Conclusión

Se cuantificó Cd en nueve tipos de muestras de almendras de cacao venezolano fermentadas, secas y tostadas, analizando por separado el nib y la cáscara. La concentración de Cd osciló entre 1,4 y 7,2 mg kg^{-1} , destacándose la muestra de híbridos internacionales de la estación experimental Miranda con la mayor concentración tanto en el nib como en la cáscara. Los resultados indicaron una tendencia en todas las muestras de mayor concentración de Cd en la cáscara en comparación con el nib, lo que sugiere la existencia de fuente de contaminación externa durante los procesos de fermentación, secado o tostado. La mayoría de las muestras excedieron el límite establecido por la Unión Europea de $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd, con la excepción de las muestras de Ocumare 61-Carúpano y Carenero – Carúpano.

Referencias

- [1] Tineo, D., Calderon, M.S., Maicelo, J.L., Oliva, M., Huamán-Pilco, Á.F., Ananco, O., and Bustamante, D.E., Characterization and phylogenetic analysis of the complete plastid genome of *Theobroma bicolor* (Malvaceae) from Peru. *Mitochondrial DNA Part B*, 9(2), pp. 227-232, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/23802359.2024.2310134>.
- [2] Di Giacobbe, M., Venezuela, cacao y chocolate: una herencia, un tesoro y una oportunidad de negocio. *Debates IESA*, XX (1), pp. 28-31, 2015.
- [3] Tacer-Caba, Z., The concept of superfoods in diet. In *The role of alternative and innovative food ingredients and products in consumer wellness*, Academic Press. 2019, pp. 73-101.
- [4] Vicentim, A., and Marcellino, M., Efeito do pó de cacau (*Theobroma Cacao*) e seus princípios ativos na pressão arterial de portadores do Diabetes Mellitus Tipo II. *Salusvita, Bauru*, 31(1), pp. 29-40, 2012.

- [5] Hassoun, A., Harastani, R., Jagtap, S., et al, Truths and myths about superfoods in the era of the COVID-19 pandemic. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 64(3), pp. 585-602, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2106939>.
- [6] Baharum, Z., Akim, A., YapYunHin, T.,...Kasran, R. Theobroma cacao: Review of the extraction, isolation, and bioassay of its potential anti-cancer compounds. *Tropical Life Sciences Research*, [online]. 27(1), pp. 21–42, 2016. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4807961/>
- [7] Pawar, V.A., Srivastava, S., Tyagi, A., Tayal, R., Shukla, S.K., and Kumar, V., Efficacy of bioactive compounds in the regulation of metabolism and pathophysiology in cardiovascular diseases. *Current Cardiology Reports*, 25(9), pp. 1041-1052, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11886-023-01917-3>.
- [8] Smaeel, A., McDermott, M.M., Joshi, J.K., et al, Cocoa flavanols, Nrf2 activation, and oxidative stress in peripheral artery disease: Mechanistic findings in muscle based on outcomes from a randomized trial. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 326(2), pp. 589-605, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00573.2023>.
- [9] Yanus, R., Sela, H., Borojovich, E.,... Karpas, Z., Trace elements in cocoasolids and chocolate: an ICPMS study. *Talanta* 119, pp. 1-4, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.048>
- [10] Pierce, E.A., The health effects of chocolate: a literature review. Senior Theses 664, University of South Carolina – Columbia, USA, [online]. 2024. Available at: https://scholarcommons.sc.edu/senior_theses/664/
- [11] Homayouni-Rad, A., Konar, N., Rasouli-Pirouzian, H., Mirtajeddini, S.B., Toker, O.S., and Rasouli-Pirouzian, R., Polyols and chocolate technology: recent developments and advances. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(1), pp. 1-8, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16175>
- [12] Internacional Cocoa Organization. *Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics*. XLII(3), London, England, 2016.
- [13] Duana-Ávila, D., Hernández-Gracia, T.J., Martínez-Muñoz, E., García-Velázquez, M.D.R., and Román-Gutiérrez, A.D. Study of the Mexican cocoa market: an analysis of its competitiveness (2010–2021). *Agronomy*, 13(2), pp. 1-12, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy13020378>
- [14] de Oliveira, A.P.F., Milani, R.F., Efraim, P., Morgano, M.A., and Tfouni, S.A.V., Cd and Pb in cocoa beans: occurrence and effects of chocolate processing. *Food Control*, 119, art. 107455, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107455>
- [15] Furcal-Beriguete, P., y Torres-Morales, J.L., Determinación de concentraciones de cadmio en plantaciones de Theobroma cacao L. en Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 33(1), pp. 122-137, 2020. DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v33i1.5027>
- [16] Mohamadi, S., Mahmudiono, T., Zienali, T., Sadighara, P., Omidi, B., Limam, I., and Fakhri, Y., Probabilistic health risk assessment of heavy metals (Cd, Pb, and As) in Cocoa powder (Theobroma cacao) in Tehran, Iran market. *International Journal of Environmental Health Research*, 34(1), pp. 257-272, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2146070>
- [17] Carlos, P.B., y Liduvina, S.Q., Metales pesados: fuentes y su toxicidad sobre la salud humana. *Revista de Ciencias*, 2(1), pp. 20–36, 2018. DOI: <https://doi.org/10.33326/27066320.2018.1.842>
- [18] Chavez, E., He, Z., and Baligar, V., Concentration of cadmium in cacao beans and its relationship with soil cadmium in southern Ecuador. *Science of Total Environment*. 533, pp. 205-214, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.1060048>
- [19] Aoac – International, Official methods of analysis of AOAC International. in: *Guidelines for standard method performance requirements (appendix F)*. Gaithersburg: AOAC International. 2016.
- [20] FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. *Guidelines for the production, processing, labelling and marketing of organically produced foods*, revised version, 2001.
- [21] Internacional Cocoa Organization. *A study on the market for organic cocoa*. EX/130/10, London, England, 2006.
- [22] ICH. Note for guidance on validation of analytical methods: methodology. *International Conference on Harmonization*, 29 November 1995.
- [23] Huamani, H., Huatuya, M., y Neira, G., Presencia de metales pesados en cultivo de cacao orgánico. *Acta Agronómica*, 61(4), pp. 339-344, 2012.
- [24] Zuñiga, F., Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados. Universidad Autónoma de Yucatán, 1^{ra}. ed., Mérida, México, 1999.
- E. Padilla**, es Lic. en Química, de la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela. ORCID: 0009-0003-9364-8622
- L. Cedeño-Sares**, es Ing. Químico desde el 2007, MSc. en Ciencia de los Alimentos en 2010, de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador, jefe del área de calidad y microbiología de la Empresa Procesadora de Productos Cárnicos Aveztruz Camalteca S.A del 2009 al 2013. Profesor titular de la Universidad Técnica de Machala desde el 2015, actualmente estudiante de Doctorado en Ciencias de los Alimentos en la Universidad de La Habana Cuba. ORCID: 0000-0002-4251-358X
- J. Domínguez (ϕ)**, es Lic. en Biología, de la Universidad Simón Bolívar Caracas, Venezuela. Amplia experiencia en métodos de cuantificación por espectroscopia de absorción atómica. Ha publicado más de 10 artículos, 1 capítulo de libro y 50 asistencia a congresos científicos. ORCID: 0009-0005-8323-3233
- F. Baldemar-Dután**, es Bioquímico Farmacéutico de la Universidad Técnica de Machala en el 2014, MSc. en Farmacia Clínica y Hospitalaria en la Universidad Uniandes de Ambato y MSc. en Gerencia en Salud en la Universidad Técnica Particular de Loja, ambos títulos obtenidos en el 2018. Desde 2015 Técnico de laboratorio de química analítica en la Universidad Técnica de Machala y luego profesor ocasional desde el 2018. Es representante técnico de una reconocida cadena de farmacias de Machala. Actualmente, está cursando una tercera maestría en Química en la Universidad Estatal de Milagro, Ecuador. ORCID:0009-0006-8675
- A. Rodríguez**, es Lic. en Química, de la Universidad Simón Bolívar Caracas, Venezuela. Dr. en Ingeniería en Materiales de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Cuenta con amplia experiencia en el área de química electroanalítica, química analítica general y electroquímica general. Autor y co-autor de varios artículos científicos indexados en revistas de alto impacto al igual que autor de varios capítulos de libros. Actualmente, se desempeña en una posición post-doctoral en el Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas, La Plata, Buenos Aires, Argentina, específicamente en el grupo de Conversión y Almacenamiento de Energía (CAE-Li), en donde su investigación se encuentra enfocada en el desarrollo de materiales electroactivos para baterías de iones de litio. ORCID: 0000-0002-2370-5711
- E. Tinoco**, es Ing. en alimentos, de la universidad Politécnico de Krasnodar, Rusia, MSc. en Ingeniería en Alimentos (Rusia) y MSc. en Seguridad Industrial y Protección del Medio Ambiente (Piura-Perú). Veinticinco años de experiencia en el análisis químico aplicado a la industria alimentaria, donde he podido combinar mi pasión por la ciencia y mi compromiso con la calidad y la seguridad alimentaria. ORCID: 0009-0007-2920-0152
- L. Fernández**, es Dra. en Química aplicada, profesora de la Pontificia Universidad Católica de Ecuador. Experiencia en liderazgo de grupos de investigación multidisciplinarios, dirección de unidades académica universitarias, así como en asesoramiento en la creación de programas de cuarto nivel en el área de Química. Investigación en Química Electroanalítica y Análisis Instrumental; enmarcada en el desarrollo de Biosensores Electroquímicos, nuevas técnicas de introducción de muestras en Espectroscopia de Absorción Atómica para en análisis de metales pesados, métodos electroanalíticos para determinación de metales, la aplicación y acoplamiento de Espectroscopia Uv-Vis, Espectroscopia IR en la caracterización molecular y superficial de la materia en el área de Electroanálisis. Autora de 70 artículos científicos, siete libros, cinco capítulos de libros, sesenta y seis asistencias a congresos internacionales y cinco premios por los mejores trabajos de investigación a nivel de doctoral. ORCID: 0000-0001-6720-6343